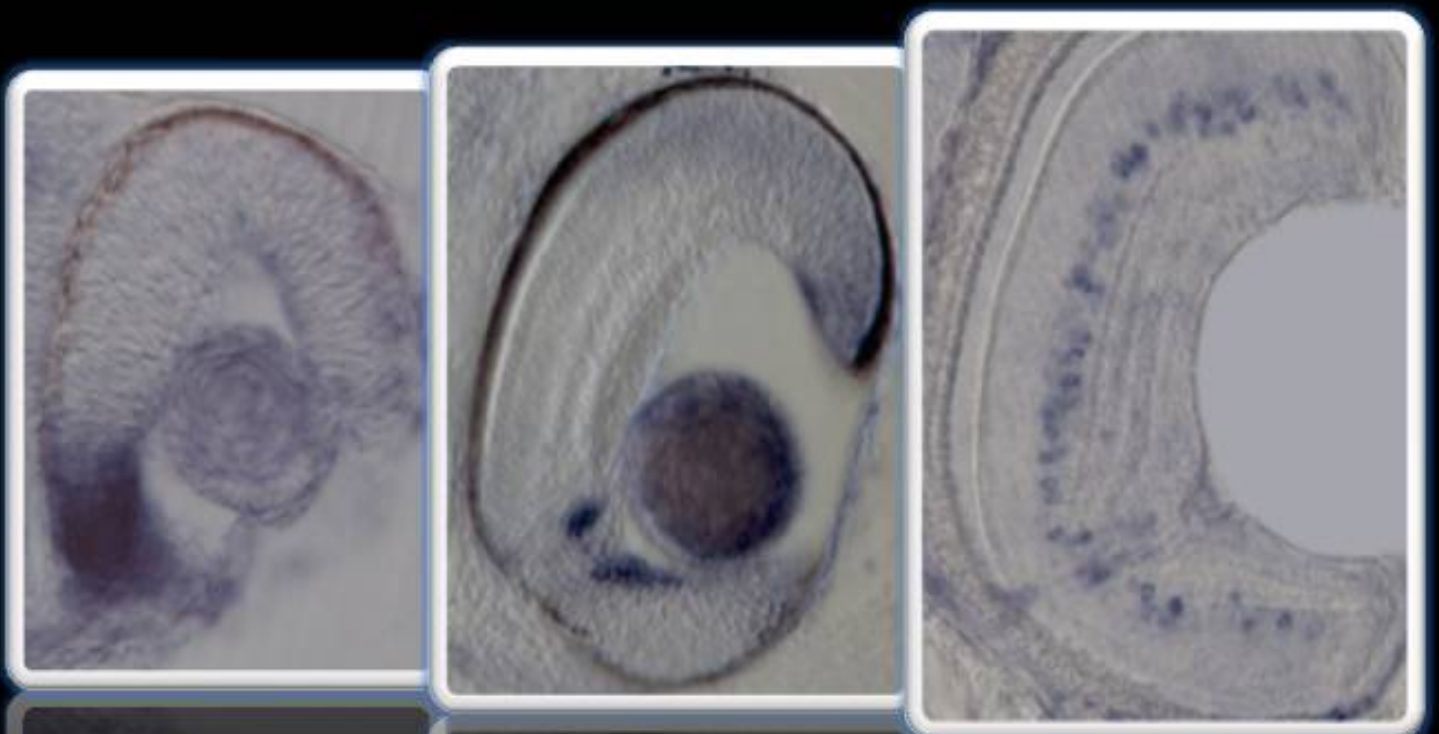


Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Estudio de la función de SFRP5 durante el
desarrollo del ojo y del techo óptico en el
*pez medaka***



José-María Ruiz González

MADRID

2009

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de la función de SFRP5 durante el desarrollo
del ojo y del techo óptico en el pez *medaka***

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor por:

José-María Ruiz González, Licenciado en Bioquímica

Dirigido por:

Paola Bovolenta Nicolao, Profesora de Investigación del CSIC
en el **Instituto de Neurobiología “Ramón y Cajal”**

ESTA TESIS DOCTORAL ESTÁ DEDICADA A:

JORGE TEVA

Porque con el paso del tiempo me he dado cuenta de que
fuiste un ejemplo para mí y para otros muchos

ÁNGELES SÁNCHEZ

Si sólo fuera una décima parte de lo que sois vosotros,
estoy seguro de que cualquier reto que me encontrara lo
solventaría sin ninguna dificultad

ZENÓN GONZÁLEZ

ELVIRA MORENO

Por vuestra gran Fe

Agradecimientos

Quiero agradecer a Paola Bovolenta permitirme realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio. Por su dedicación y su enorme paciencia, así como el hecho de que me permitiera aprender cómo hay que desarrollar un proyecto de investigación. También le estoy sumamente agradecido por haberme dado la oportunidad de trabajar en colaboración con otros miembros del laboratorio en diferentes proyectos que se han plasmado en forma de dos revisiones científicas (Bovolenta et al., 2008; Sanchez-Camacho et al., 2005) y dos artículos en revistas de gran relevancia (Lopez-Rios et al., 2008b; Rodriguez et al., 2005).

Sin embargo, todo comenzó en el laboratorio de Roberto Marco (D.E.P.), donde realicé el trabajo para la obtención del D.E.A. Para mí, es un verdadero orgullo haber conocido a Roberto.

De todo corazón tengo que agradecer el trabajo de tres personas, fundamentales no sólo para mí sino también para otros muchos: Isidro Dompablo y Jazzmín Fermín en el Instituto Cajal, y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UAM, Pilar Ochoa. De ellos no tengo más que buenas palabras. Me han enseñado una enorme cantidad de cosas, tanto a nivel profesional como a nivel personal, y eso les hace grandes.

En el laboratorio B01 del Instituto Cajal hay muchas personas que me han ayudado mucho en la consecución de este trabajo, son: Ivan Conte, Pilar Esteve, Javier López-Ríos, Juan Ramón Martínez-Morales y Josana Rodríguez. Pero tampoco puedo olvidar del resto de miembros del laboratorio que de alguna forma también han colaborado (aunque sea psicológicamente): Leonardo Beccari, Elsa Cisneros, Ivan Conte, Alejandro de la Torre, Chiara Marchisone, Raquel Marco, Julián Morcillo, José-Luis Mullor, Isabel Rodrigo, África Sandonís, Cristina Sánchez y las recientes incorporaciones: Séverine, Marcos, y Macu.

Durante mis dos primeros años en los que obtuve el DEA, en la UAM (en el B20), no me puedo olvidar de Carlos Díaz, Raúl Herranz, David Husson, Jesús Mateos o Aida Villa.

Especial mención a cuatro personas de las que me siento enormemente orgulloso de haber trabajado y compartido tanto con ellas. Todos ellos, con sus virtudes y defectos, son fenomenales y fantásticos. Ellos son Raquel Marco (B19 y B01), Julián Morcillo, Josana Rodríguez e Ivan Conte.

Como de buen nacido es ser agradecido, es el momento de mencionar a toda la gente que me ha mostrado su apoyo todo este tiempo (sobre todo en algunos momentos “críticos”) y otros que lo han hecho sin ni siquiera saberlo. Si me dejo alguno es por mala memoria: Roberto, David, Dani, Sergio, Sofía, Fermín, Edu, Eva, Esther, Daniel, José o Guillermo.

Con un especial cariño les agradezco a mis padres, José-María y María Isabel, su paciencia, su afecto y su apoyo. De la misma forma a mis hermanas Susana y Cristina, y a mi tía Laura. Y con más cariño si cabe, a mis abuelos, cuya fe siempre me ha mantenido en pie, y es que como los abuelos no hay nadie.

A Jorge Teva (D.E.P.) porque estoy seguro que hubieras disfrutado muchísimo con este trabajo. Tu ejemplo y tu valor, son los míos.

A Luis, porque durante este último año, has sido una constante fuente de fuerza, coherencia y cordura. Lo que me has aportado es algo de lo que no te haces idea. Espero poder hacer igual contigo.

A mis niños Hércules, Orión y Casiopea (y en el futuro a Lt. Ripley). Una responsabilidad y una alegría. Al igual que Ron y Kira. Todos ellos una constante fuente constante de ternura.

A todos ellos, gracias.

1. RESUMEN/SUMMARY

Resumen: La ruta de señalización de WNT es un complejo mecanismo de comunicación celular que juega un relevante papel en multitud de procesos homeostáticos y del desarrollo embrionario, entre los que se incluye la formación del ojo. Debido a su gran complejidad, este mecanismo está regulado a diferentes niveles. Las proteínas SFRP (Secreted Frizzled related proteins), que comprenden la mayor familia de moduladores de la señalización de WNT, son proteínas solubles cuya estructura presenta similitudes a los receptores Frizzled. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que un miembro de esta familia, *Sfrp1*, que se expresa abundantemente durante el desarrollo del ojo tanto en aves como en peces, contribuye a la especificación del campo morfogénico del ojo en la placa neural anterior, regula la neurogénesis de la retina y la guía de los axones de las células ganglionares de la retina.

Los diferentes eventos de duplicación de los genomas son la base de la evolución de los metazoos. Mientras que la mayoría de los vertebrados presentan un contenido génico correspondiente a dos rondas de duplicación genómica, los peces teleósteos han sufrido una duplicación genómica adicional que condujo en muchos casos a una sub-funcionalización o una nueva funcionalización de los genes parálogos resultantes. En esta Tesis nos preguntamos si el genoma del pez *medaka* (*Oryzias latipes*) presenta una duplicación del gen *olSfrp1* y si, en el caso de existir, sus funciones son similares o complementarias a las que se habían caracterizado para *olSfrp1*. Identificamos un cDNA cuya secuencia era muy similar a *olSfrp1*, aunque en realidad, gracias al análisis filogenético, determinamos que pertenecía a la subfamilia de genes de los *Sfrp5*. De forma similar a *olSfrp1*, este gen, que denominamos *olSfrp5*, se expresa abundantemente durante el desarrollo del ojo, aunque también se expresa en el mesencéfalo y el primordio del aparato digestivo. La disminución de la expresión de *olSfrp5* mediante la inyección de morfolinós causa microftalmia y un defecto en el desarrollo del techo óptico. Adicionalmente en el ojo, la interferencia de la expresión de *olSfrp5* causa un defecto en la regionalización ventral de la copa óptica que en algunos casos provoca la aparición de colobomas oculares. Estos defectos tempranos conducen a una alteración de la neurogénesis del ojo y del techo óptico. En particular, se reducen el número de RGC y de fotorreceptores en el ojo. Por otra parte, las proyecciones de los axones de las RGC eran normales en los embriones morfantes.

Estos resultados indican que la actividad de olSFRP5 es requerida desde estadios tempranos para la generar el número apropiado de progenitores oculares y tectales y la subsiguiente diferenciación de los mismos. También indican que, de forma parcial, tanto olSFRP1 como olSFRP5 tienen funciones redundantes durante el desarrollo del ojo. En el futuro habrá que determinar si el fenotipo resultante de interferir la función de *olSfrp5* es la consecuencia de la alteración de la vía canónica o de las vías no canónicas de los WNT.

Summary: The Wnt signalling pathway is a complex and widely used mechanism of cell to cell communication, which plays a major role in many homeostatic and developmental processes, including eye formation. Due to its complexity, this pathway is highly regulated at different levels. Secreted Frizzled-related proteins (SFRPs), soluble proteins structurally related to Frizzled (Fz), compose the largest family of extracellular modulator of Wnt signalling. Previous work from the laboratory demonstrated that a specific member of the Sfrp family, *Sfrp1*, is strongly expressed throughout eye development in both birds and fishes, and contributes to the specification of the eye field within the anterior neural plate and thereafter regulates retina neurogenesis and retina ganglion cell axon guidance.

Rounds of genome duplication seem to be at the basis of metazoan evolution. While the majority of higher vertebrates have a gene content that corresponds to two rounds of duplication, teleost fishes underwent an additional round, which seems to have generated in many cases sub-functionalisation or neo-functionalisation of the resulting paralog genes. In this thesis we have asked whether the genome of the medaka fish (*Oryzias latipes*) contains an additional *olSfrp1* paralog and whether its functions are similar or complementary to those of the already characterized *olSfrp1*. We report the identification of a cDNA closely related to *olSfrp1* that however, belongs to the related *Sfrp5* subfamily as established by phylogenetic analysis. Similarly to *olSfrp1*, this gene, named *olSfrp5*, is strongly expressed in the developing eye but is additionally expressed in the midbrain and gut primordium. Morpholino-based interference with embryonic *olSfrp5* expression causes microphthalmia and impairs tectal development. These defects are associated with an increase in the rate of both cell proliferation and cell death in the retinal and tectal neuroepithelium. Furthermore, interference with *olSfrp5* levels of expression impairs the patterning of the ventral portion of the optic cup, leading in some cases to a ventral coloboma. These early defects are followed by an abnormal retinal and tectal neurogenesis. In particular, only reduced numbers of photoreceptor and RGC were generated. The projection of RGC axons were however normal.

These results indicate that olSFRP5 activity is required from optic vesicle stage for the generation of appropriate number of retinal and tectal progenitor cells and is subsequently involved in their differentiation. They also indicate that olSFRP1 and olSFRP5 have only partially redundant function during eye development. Whether the phenotype resulting from *olSfrp5* interference is the consequence of impaired canonical or non canonical Wnt signaling or whether additional pathways are involved still need to be determined.

2. ÍNDICE

1.	RESUMEN EN INGLÉS-SUMMARY	1
2.	ÍNDICE	3
3.	ABREVIATURAS.....	7
4.	INTRODUCCIÓN.....	11
4.1.	La vía de señalización de los WNT.....	12
4.2.	Modulación de la señalización de los WNT.....	15
4.3.	El desarrollo temprano del ojo en vertebrados.....	16
4.4.	Especificación molecular temprana del desarrollo del ojo.....	17
4.5.	Regionalización de las vesículas ópticas.....	19
4.6.	Neurogénesis de la retina.....	21
4.7.	Guía axonal en la vía visual.....	23
4.8.	Los SFRP (Secreted Frizzled Related Proteins)	25
4.8.1	Estructura de los SFRP.....	25
4.8.2	La familia de proteínas de los SFRP.....	26
4.8.3.	Funciones de los SFRP.....	27
4.8.4.	Los SFRP durante el desarrollo del ojo.....	29
5.	OBJETIVOS.....	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1	Modelos animales: pez <i>medaka</i>	34
6.2	Clonación de <i>Sfrp5</i> de <i>medaka</i> (<i>olSfrp5</i>)	34
6.3	Estudio filogenético.....	35
6.4	Clonación de la región 5' no traducida de <i>olSfrp5</i> de <i>medaka</i>	36
6.5	Morfolinos.....	37
6.5.1	Morfolinos para <i>olSfrp5</i>	38
6.5.2	Morfolinos de <i>Sfrp1</i> de <i>medaka</i>	38
6.5.3	Generación del mRNA control del morfolino de <i>olSfrp5</i>	38
6.6	Hibridaciones <i>in situ</i>	39
6.6.1	Ribosondas de <i>medaka</i>	39
6.6.2	Generación de sondas.....	40
6.6.3	Hibridación <i>in situ in toto</i> en embriones de pez <i>medaka</i>	40
6.7	Microinyección de embriones de <i>medaka</i>	41
6.8	Análisis de la proliferación celular.....	42
6.9	Análisis de la muerte celular.....	42
7.	RESULTADOS.....	43
7.1	Clonación del gen <i>Sfrp5</i> en el pez <i>medaka</i>	44
7.2	Análisis filogenético de la familia de los SFRP.....	44
7.3	Patrón de expresión de <i>olSfrp5</i>	47
7.4	Determinación de la eficacia de los distintos morfolinos.....	49
7.5	Fenotipos inducidos por la pérdida de función de <i>olSfrp5</i>	51
7.6	La reducción de los niveles de <i>olSfrp5</i> provoca microftalmia.....	52
7.7	olSFRP5 controla la proliferación celular durante el desarrollo de las copas ópticas.....	53
7.8	Los morfantes de <i>olSfrp5</i> aumentan los niveles de apoptosis durante el desarrollo ocular.....	55
7.9	La disminución de la expresión de <i>olSfrp5</i> causa defectos en la regionalización de la copa óptica y ocasionalmente colobomas.....	57
7.10	olSFRP5 es necesario en la diferenciación de la neurorretina.....	61

7.10	olSFRP5 es necesario en la formación del techo óptico.....	64
7.11	Los morfantes de <i>olSfrp1</i> pero no los de <i>olSfrp5</i> presentan alteraciones en el crecimiento de los axones de las RGC.....	66
8.	DISCUSIÓN.....	71
8.1	El estudio del gen <i>Sfrp5</i> en vertebrados.....	72
8.2	olSFRP5 podría modular los niveles de apoptosis durante el desarrollo del ojo y del techo óptico.....	73
8.3	olSFRP5 es necesario para la neurogénesis de la retina y del techo óptico.....	74
8.4	olSFRP5 es necesario la regionalización dorsoventral de la copa óptica, favoreciendo la expresión de genes implicados en el cierre de la fisura óptica.....	75
8.5	olSFRP1 participa en la guía de los axones de las RGC, olSFRP5 no.....	75
8.6.	olSFRP5 es necesario para el correcto desarrollo del ojo y del techo óptico en el pez <i>medaka</i>	76
9.	CONCLUSIONES.....	79
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	81
11.	ARTÍCULOS.....	97
10.1	Morphogens as growth cone signalling molecules. <i>Brain Research Reviews</i> . 2005.....	99
10.2	Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. <i>Journal of Cell Science</i> . 2008.....	110

3. ABREVIATURAS

<i>A</i>	<i>Ambystoma mexicanum</i>	FZ	Frizzled
ATH	Atonal homolog	GFP	Green fluorescent protein
AVE	Anterior visceral endoderm	GH6	H6 family homeobox
BF1	Forkhead box G1	GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
bHLH	b-Helix loop helix	<i>H</i>	<i>Homo sapiens</i>
BMP	Bone morphogenetic protein	HBFG/SC	Heparin binding factor hepatocyte growth factor/scattered factor
bp	Base pairs	HES	Hairy and enhancer of split
BSA	Bovine serum albumin	HESX	Homeobox expressed in ES cells
<i>bt</i>	<i>Bos taurus</i>	Hpf	Horas post-fertilización
Ca ²⁺	Calcium	INL	Inner nuclear layer
CALCN	Calcineurin	IPL	Inner plexiform layer
CAMKII)	Calcium calmodulin kinase II	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
cDNA	Complementary DNA	JNK	Jun kinase
CDS	Coding sequence	k.o.	Knock-out
<i>ce</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>lb</i>	<i>Lubomirskia baicalensis</i>
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
CHX10	Ceh-10 homeodomain containing homolog	LGN	Lateral geniculate nucleus
<i>ci</i>	<i>Ciona intestinalis</i>	LHX	LIM homeobox
CK γ 1	Casein kinase γ 1	LRP	Low density lipoprotein receptor-related proteins
CRD	Cysteine rich domain	<i>m</i>	<i>Mus musculus</i>
CRX	Cone-rod homeobox	MC	Margen ciliar
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas	MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
C _t	Carboxilo terminal	Mo1	Morfolino olSFRP1
CYC-D1	Cyclin D1	MoA	Morfolino olSFRP5 a
DEP	Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain	MoB	Morfolino olSFRP5 b
DIX	Dishevelled and Axin binding domain	MoMissB	Morfolino mismachted olSFRP5 b
DNA	Deoxyribonucleic acid	mRNA	Messenger ribonucleic acid
DSH	Dishevelled	NeuroD	Neurogenic differentiation
EBI	European Bioinformatics Institute	NF-AT	Nuclear factor of activated T cell
eGFP	Enhanced green fluorescent protein	NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	NGN	Neogenin homolog
EMX	Empty spiracles homolog (<i>Drosophila melanogaster</i>)	NO	Nervio óptico
EN-2	<i>Engrailed 2</i>	NR	Neuroretina
EPH	Ephrin receptor tyrosine kinase	N _t	Amino terminal
<i>f</i>	<i>Fugu rubripes</i>	NTR	Netrin like domain
FGF	Fibroblast growth factor	<i>o</i>	<i>Oryza latines</i>
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	olAth5::eGFP	Peces <i>medaka</i> trasgénicos con el promotor de Ath5 y como gen reportero la eGFP
FIG	Figura	ONL	Outer nuclear layer
FOXN4	Forkhead/winged helix transcription factor	OPL	Outer plexiform layer
FRL1	Fibroblast growth factor receptor ligand 1	OTX	Orthodenticle homolog (<i>Drosophila melanogaster</i>)
FRZA	Frizzled related A (xSFRP1)	PAX	Paired box gene
FRZB	Frisbee (xSFRP3)	PCP	Planar cell polarity

PCR	Polymerase chain reaction		integration site
PDZ	Domain present in PSD-95, Dlg and Zo-1/2	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
PDZ-BD	Post-synaptic density-95, discs-large and zonula occludens-1 binding motifs	<i>Xl</i>	<i>Xenopus laevis</i>
PH3	Phosphohistone H3	<i>Xt</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>
PK-A	Protein kinase A	<i>z</i>	<i>Danio rerio</i> , zebrafish
PK-C	Protein kinase C	Zo-1/2	<i>Zona occludens</i> protein
POLCE	Procollagen C-proteinase enhancer		
PRX	Paired family homeodomain protein		
QO	Quiasma óptico		
RANK	Receptor activator of NF-κB ligand		
RD	Rhodopsine		
RGC	Retinal ganglion cells		
RNA	Ribonucleic acid		
Robo	Roundabout		
ROR	tyrosine kinase-like orphan receptor		
RPE	Retinal pigment epithelium		
RX	Retinal homeobox		
RYK	Receptor-like tyrosine kinase		
SFRP	Secreted frizzled related protein		
SHH	Sonic hedgehog homolog (<i>Drosophila melanogaster</i>)		
SIX	Sine oculis homeobox homolog (<i>Drosophila melanogaster</i>)		
SNC	Sistema nervioso central		
SOHo1	Sensory organ homeobox protein		
<i>Sp</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>		
st	stage		
TBX	T-box transcription factor		
TCF	Transcription Factor		
TGF	Transforming growth factor		
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases		
Tlc	Telencephalic		
<i>tn</i>	<i>Tetraodon nigrividis</i>		
<i>tn</i>	<i>Tetraodon nigrividis</i>		
TO	Techo óptico		
TUNEL	TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) mediated dUTP nick end-labelling		
<i>unc</i>	<i>Uncoordinated</i>		
UTR	Untranslated region		
VAX	Ventral anterior homeobox		
<i>wgl</i>	<i>Wingless</i>		
WIF	Wnt inhibitor factor		
WNT	<i>Wingless</i> -related MMTV		

4. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario las células se comunican y se coordinan entre ellas, consiguiendo que desde un conjunto de células indiferenciadas se generen órganos y tejidos. Esta información está proporcionada por diferentes moléculas, y entre ellas se encuentran los morfógenos, proteínas que se distribuyen en gradientes en el embrión. Los morfógenos se pueden definir como moléculas secretables de señalización celular, generadas por un grupo de células de un tejido, que se distribuyen de forma específica para determinar el destino de otras células sobre las que señalizan. Durante el desarrollo embrionario hay un gran número de proteínas secretables implicadas en la señalización celular, pero sólo unas pocas familias de proteínas se ajustan al concepto de morfógenos. Entre ellas se encuentran miembros de las familias de HH (Hedgehog), WNT (*wingless*), TGF (Transforming growth factor) o FGF (Fibroblast growth factors) (Gurdon and Bourillot, 2001; Smith and Gurdon, 2004; Tabata and Takei, 2004). Estas familias de moléculas señalizadoras activan cascadas intracelulares que controlan la transcripción de genes determinados. Además, este pequeño número de morfógenos se usa repetidamente durante el desarrollo de tejidos y órganos durante toda la embriogénesis.

Algunos ejemplos de cómo los morfógenos funcionan durante el desarrollo se encuentran durante el establecimiento del eje anteroposterior en la placa neural anterior por proteínas de la familia de las glicoproteínas WNT (Wilson and Houart, 2004). También, durante la especificación de la identidad neuronal a lo largo del eje dorsoventral en el tubo neural, por la señalización antagónica de las BMP (Bone morphogenetic proteins) y SHH (Sonic Hedgehog) (Jessell, 2000; Lee and Jessell, 1999); o durante la especificación de la región del istmo, controlada por un miembro de la familia de FGF, FGF8 (Martinez, 2001). El estudio de las funciones de los morfógenos durante el desarrollo embrionario ha permitido conocer los mecanismos de señalización en los que intervienen. Además, se han descrito otras funciones en las que estas moléculas señalizadoras intervienen como la proliferación, supervivencia, migración celular, eventos de regeneración o en diferentes patologías.

4.1 La vía de señalización de WNT

Las glicoproteínas secretables WNT, codificadas por genes de secuencias homólogas al gen *Wingless (Wgl)* de *Drosophila*, forman una familia con un gran número de variadas funciones y activan diferentes cascadas de señalización. En la página de Internet “Wnt homepage”: (<http://www.stanford.edu/~rnusse/Wntwindow.html>) se encuentra disponible gran parte de la información referida a esta familia de proteínas. Las funciones de los WNT comenzaron a estudiarse en diferentes procesos tumorigénicos y su implicación en enfermedades humanas, y también durante el desarrollo embrionario. En humanos existen 19 genes, y algunos de ellos presentan procesamientos alternativos de sus mRNAs.

Se han realizado numerosos estudios sobre las vías de señalización mediadas por los WNT, mostrando un entramado complejo de señalización en el que se han descrito 3 vías de señalización iniciadas por estas proteínas (**FIG. 1**) (Gordon and Nusse, 2006; Miller et al., 1999). Estas vías de señalización son tres rutas no lineales y no independientes, con diversos mecanismos de interacción y regulación. La vía más estudiada es la vía canónica o de la β -catenina, que conlleva la estabilización de β -catenina citosólica, su transporte al núcleo y la inducción de la transcripción de genes diana utilizando como cofactores miembros de la familia TCF/LEF (T-cell transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor). Funcionalmente, la sobreactivación de la vía canónica en embriones de *Xenopus* por sobreexpresión de algunos WNT, como WNT1, WNT3A, WNT8 o WNT8B, provoca duplicaciones del eje anteroposterior (Smith and Harland, 1991; Sokol et al., 1991).

Las vías no canónicas son: la vía PCP (Planar Cell Polarity) que activa a la JNK (quinasa de c-Jun) y promueve cambios en el citoesqueleto (Heisenberg et al., 2000); y la vía del calcio (Ca^{2+}) (Slusarski and Pelegri, 2007), cuya activación origina un acúmulo de Ca^{2+} en el citoplasma, activando a la CALC (calcineurina), la CAMKII (Ca^{2+} calmodulina quinasa II) y la PKC (proteína quinasa C). Estudios funcionales han descrito que el funcionamiento de estas vías es necesario durante la embriogénesis para los movimientos de convergencia y extensión que se dan en la gástrula (Tada et al., 2002), y que la sobreactivación de estas vías no causa duplicaciones de eje en embriones de *Xenopus* (Pandur et al., 2002).

Los receptores de los WNT son: los receptores con 7 pasos de hélice transmembrana Frizzled (FZ), los receptores tirosina-quinasa RYK (receptor-like tyrosine kinase) y ROR (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor), y el receptor FRL1 (Fibroblast growth factor receptor ligand 1) (Forrester et al., 2004; Green et al., 2007; Halford and Stacker, 2001; Tao et al., 2005; Wang et al., 2006).

Los receptores FZ son los que se encuentran mejor caracterizados, con 10 genes en humanos. Estas proteínas presentan en el extremo amino terminal un dominio extracelular rico en cisteínas denominado CRD (cysteine rich domain) (Gordon and Nusse, 2006; Wang et al., 2006). El extremo carboxilo terminal corresponde a la región intracelular y presenta dos dominios PDZBM (Post-synaptic density-95, discs-large and zonula occludens-1 binding motifs) de unión a proteínas con motivos PDZ y una región para el acoplamiento a proteínas G heterotriméricas.

Los receptores RYK constan de diferentes dominios. En el segmento extracelular del receptor se encuentra un dominio WIF, relacionado a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor) con capacidad de unión a WNT. En el segmento citoplasmático, se encuentra un dominio catalítico tirosina-quinasa inactivo y un dominio PDZ (Halford and Stacker, 2001).

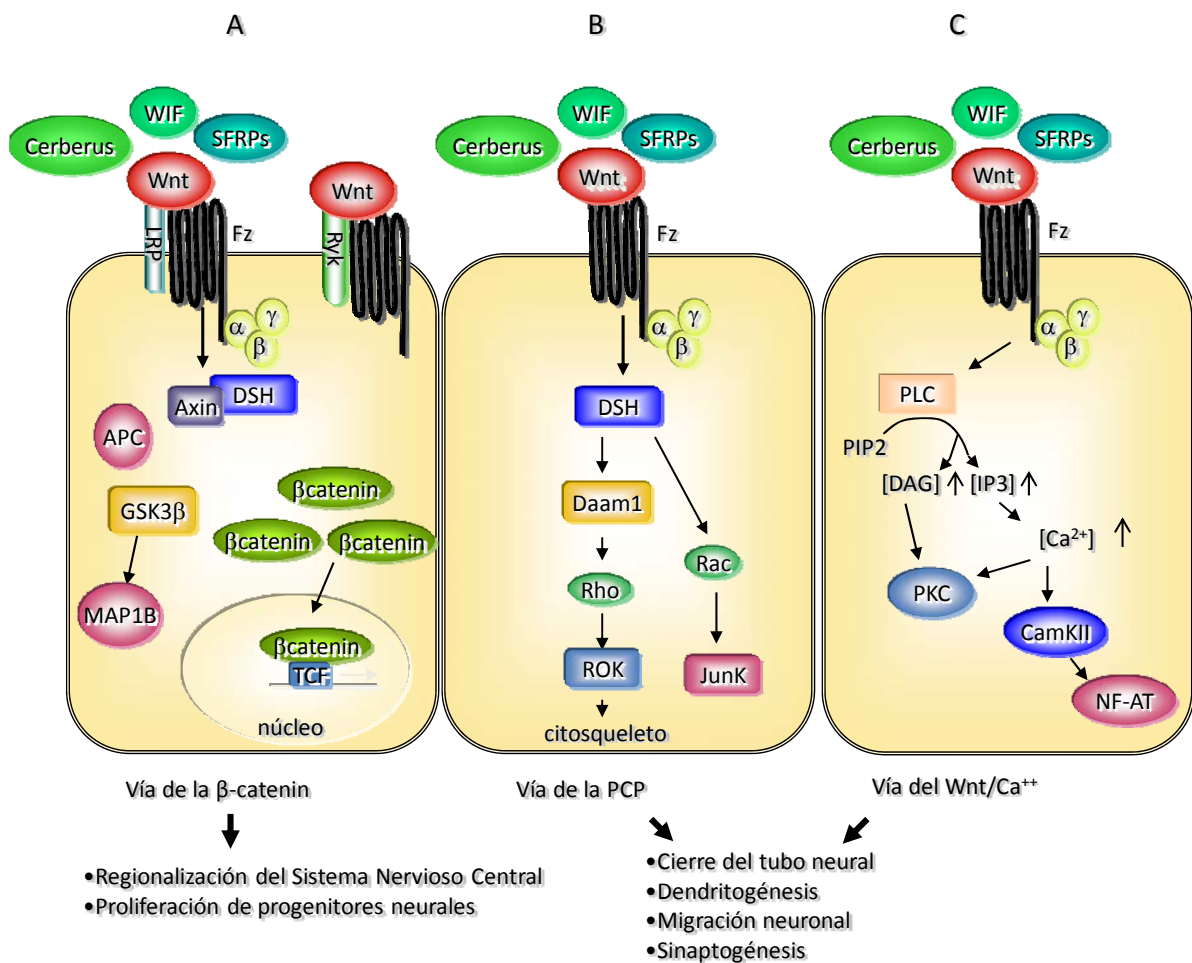


Figura 1: Mecanismos de señalización de los WNT y sus funciones durante el desarrollo

A. Vía canónica: La unión de WNT a sus receptores FZ (pueden intervenir los correceptores LRP), o RYK provoca una cascada intracelular que conlleva la inhibición de la GSK3-β (Glycogen synthase kinase 3 β), y la estabilización de la β-catenina que pasa al núcleo donde se une a factores de transcripción como los TCF permitiendo la expresión de genes diana.

B. Vía de la PCP: La unión de WNT a su receptor FZ provoca una cascada intracelular que activa proteínas G monoméricas como Rho y Rac, que pueden tener efectos sobre el citoesqueleto celular.

C. Vía del Calcio: La unión de WNT a su receptor FZ provoca una cascada intracelular activando la PL-C y su mecanismo de señalización.

Las diferentes vías de señalización pueden estar moduladas extracelularmente por proteínas como Cerberus, WIF o los SFRP.

Abreviaturas: APC, Adenomatosis polyposis coli; Ca²⁺, Calcium; CamK II, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; Daam1, Aishevelled associated activator of morphogenesis 1; DAG, Diacylglycerol; Dsh, Dishevelled; GSK-3β, Glycogen synthase kinase 3 β; IP3, Inositol triphosphate; LRP, Low density lipoprotein receptor-related proteins; MAP-1B, Microtubule associated protein 1B; NFAT, Nuclear factor of activated T-cells; PIP2, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC, Protein kinase C; PLC, Phospholipase C; Rac, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Ras, Harvey rat sarcoma virus oncogene; Rho, Ras homolog; ROK, Rho-kinase; RYK, Receptor-like tyrosine kinase; SFRP, Secreted frizzled related proteins; TCF, Transcription factor 7-like 1a (T-cell specific transcription factor, HMG (High mobility group)-box); WIF, WNT inhibitor factors.

Figura adaptada de (Bovolenta et al., 2006)

Otros receptores de los WNT son el receptor tirosina quinasa ROR (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor), cuya activación inhibe la vía canónica (Forrester et al., 2004; Green et al., 2007; Mikels and Nusse, 2006a; Mikels and Nusse, 2006b); o el receptor FRL1 (Fibroblast growth factor receptor ligand 1), que al unir a WNT11 también provoca la activación de la vía canónica (Tao et al., 2005).

4.2 **Modulación de la señalización de WNT**

La regulación de la señal mediada por los WNT se realiza a diferentes niveles. A nivel extracelular se encuentran proteínas que interaccionan directamente con los WNT imposibilitando su interacción con los receptores FZ. Estas proteínas son: Cerberus, que fue el primer inhibidor secretado de los WNT en identificarse (Glinka et al., 1997) y cuya sobre-expresión en *Xenopus* genera cabezas ectópicas (Bouwmeester et al., 1996); la proteína secretada WIF (WNT inhibitor Factor) que presenta un dominio WIF capaz de unir e inhibir a los WNT que activan la vía canónica (Hsieh et al., 1999); y los SFRP (Secreted Frizzled Related Proteins), que son el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral y de los cuales se hablará más adelante (Kawano and Kypta, 2003).

Otros moduladores extracelulares son las proteínas Dickkopf (DKK), las cuales imposibilitan la interacción de los WNT con los receptores FZ al unirse a los correceptores LRP5/6 (Lipoprotein receptor-related protein) inhibiendo la vía canónica. Por otra parte, los correceptores LRP actúan como reguladores de la señalización de los WNT a nivel de membrana, activando la vía canónica (Schweizer and Varmus, 2003) e inhibiendo la vía del Ca^{2+} (Tahinci et al., 2007). Además, el mecanismo de inhibición de los WNT por parte de DKK también puede implicar la formación de un complejo ternario junto a las proteínas transmembrana Kremen y LRP, induciendo la endocitosis de este complejo (Davidson et al., 2002; Kawano and Kypta, 2003; Mao et al., 2002).

A nivel intracelular, los receptores FZ pueden unirse con diferentes proteínas que componen la cascada de señalización intracelular. La interacción de la proteína Kermit con xFZ3 (Tan et al., 2001) activa la vía canónica, mientras que la interacción de la fosfatasa FRIED (Frizzled interaction and ectoderm development) con FZ8 activa las vías no canónicas (Itoh et al., 2005). Otros moduladores intracelulares que actúan sobre la capacidad de acción de los correceptores LRP son las proteínas Wise, esclerostatina, CK-1 γ (Casein kinase 1 γ) o R-espondina (Quaiser et al., 2006).

Un elemento clave para la transducción de la señal de WNT a nivel intracelular es la proteína *Dishevelled* (DSH), elemento compartido por las tres cascadas de señalización (Malbon and Wang, 2006). DSH actúa como una proteína de andamiaje, en la que pueden acoplarse otras proteínas necesarias para la regulación de la señalización mediada por los WNT. DSH consta de tres dominios responsables de la unión con otras proteínas: en el extremo amino terminal un dominio DIX (Dishevelled and Axin binding domain), en la región medial un dominio PDZ, y en el

extremo carboxilo terminal un dominio DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain). Entre las proteínas con las cuales DSH es capaz de interactuar se encuentran quinasas, fosfatasa, proteínas adaptadoras, proteínas intercambiadoras de nucleótidos u otras proteínas de andamiaje (como la propia DSH).

4.3 El desarrollo temprano del ojo en vertebrados

El ojo es una estructura especializada del sistema nervioso capaz de captar la luz visible, transformarla a señales electroquímicas y enviar esta información mediante impulsos nerviosos a diferentes estructuras del cerebro para su procesamiento. Hace más de un siglo, Santiago Ramón y Cajal describió la estructura la retina de diferentes vertebrados (Ramón y Cajal, 1888a; Ramón y Cajal, 1888b; Ramón y Cajal, 1891; Ramón y Cajal, 1892a; Ramón y Cajal, 1892b) (**FIG. 2**), colocando los pilares de estudios posteriores sobre la actividad y el desarrollo del sistema visual.

El desarrollo del ojo consta de una serie de etapas morfológicamente identificables (Chow and Lang, 2001) (**FIG. 3**). Durante la embriogénesis, la primera evidencia morfológica del desarrollo del ojo es la formación de los primordios ópticos, derivados de la aparente evaginación bilateral del tubo neural anterior que, en conjunción con movimientos morfogenéticos, forman las vesículas ópticas. Las vesículas ópticas crecen y entran en contacto físico con el ectodermo circundante (McAvoy, 1980). En este momento el intercambio bidireccional de señales entre el ectodermo y las vesículas ópticas produce la inducción de la placoda lente (Chow and Lang, 2001).

A continuación, se produce una invaginación coordinada de la placoda de la lente y de la región externa de la vesícula óptica. La placoda de la lente invagina formando la vesícula de la lente. La vesícula óptica dará lugar a la copa óptica, que es una estructura de dos capas: la capa más interna dará lugar a la neuroretina (NR) y la más externa al epitelio pigmentado de la retina (RPE). Ambas estructuras se mantienen unidas al tubo neural

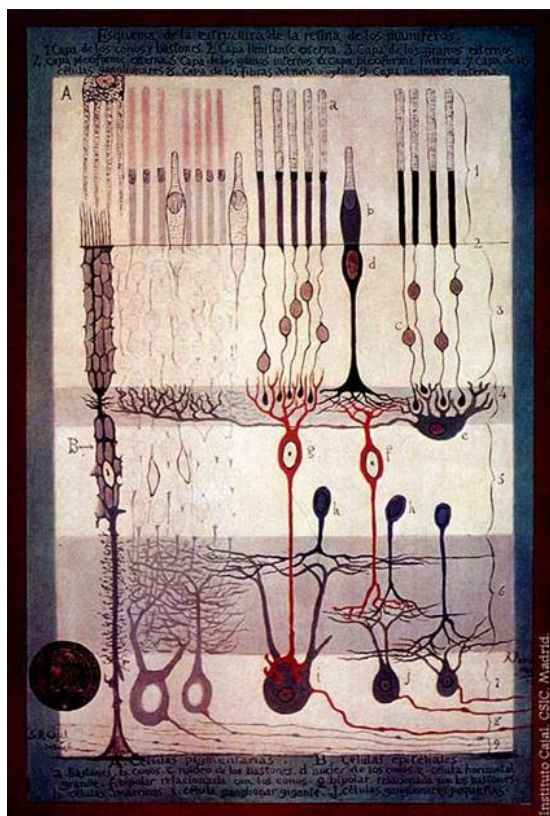


Figura 2: Esquema de la estructura de la retina de los mamíferos

Dibujo delineado por Santiago Ramón y Cajal y pintado por Ramón Padró, que muestra el epitelio pigmentado de la retina (**A**) y los principales tipos celulares de la retina (**B**): fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células ganglionares, glía de Müller (Ramón y Cajal, 1891).

mediante el tallo óptico.

La vesícula de la lente va a sufrir un proceso de engrosamiento y las células fibrosas de la lente proliferan y diferencian comenzando a expresar proteínas de la familia de las cristalinas, que se colocan de forma característica en los somas de las células, contribuyendo a la transparencia y propiedades refractarias de la lente adulta llamada cristalino (Lang, 2004).

En la región ventral de la copa óptica se produce una invaginación que forma un surco denominado fisura óptica. La fisura óptica es una estructura temporal, y pasado un tiempo, se cierra al fusionarse sus bordes en la línea media ventral de la copa óptica. Esta estructura constituye el canal por donde los vasos sanguíneos entran al ojo y por donde discurren los axones de las células ganglionares de la retina (RGC, retinal ganglion cells). La región de transición situada entre la NR y el tallo óptico va a formar el disco óptico, por donde los axones de las RGC convergen antes de salir de la NR.

Posteriormente, se producen diferentes eventos, de los que hablaremos más adelante, que incluyen procesos proliferativos, de diferenciación, laminación y el establecimiento de las conexiones nerviosas entre las propias células de la retina y también con las estructuras del cerebro.

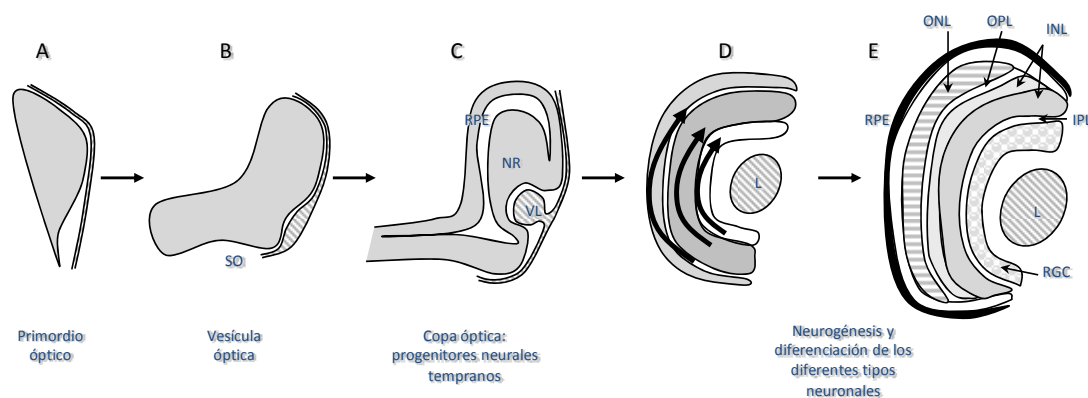


Figura 3: Esquema del desarrollo temprano del ojo a nivel morfológico.

El desarrollo del ojo comienza con la formación del primordio óptico en la región anterior del tubo neural (A), que en conjunción con movimientos morfogenéticos va a formar la vesícula óptica (B). El extremo distal de la vesícula óptica invagina para formar la copa óptica (C), y determina el territorio de la neurorretina (NR) y el epitelio pigmentado de la retina (RPE). Al mismo tiempo el ectodermo del extremo de la copa óptica engrosa e invagina para formar la vesícula de la lente (VL). Posteriormente se produce la neurogénesis de la retina (D). Tras un proceso de maduración la retina la componen diferentes tipos celulares dispuestos en capas que se conectan sinápticamente entre ellas, estas células maduran para obtener un ojo funcional (E).

Abreviaturas: INL, capa nuclear interna (inner nuclear layer); IPL, capa plexiforme interna (inner plexiform layer); L, lente; ONL, capa nuclear externa (outer nuclear layer); OPL, capa plexiforme externa (outer plexiform layer); RGC, retinal ganglion cells; SO, surco óptico; VL, vesícula de la lente.

4.4 Especificación molecular temprana del desarrollo del ojo

Tras la inducción neural producida por proteínas de las familias de BMP, FGF, WNT y Notch (Chuang and Raymond, 2002; Marikawa, 2006; Stern, 2006), en la región más anterior de la

placa neural se va a especificar el campo morfogenético del ojo (Barishak and Ofri, 2007; Chuang and Raymond, 2002). Para este fin, se necesitan diferentes señales extrínsecas e intrínsecas que pertenecen a unas pocas familias de proteínas (Chow and Lang, 2001; Esteve and Bovolenta, 2006) (**FIG. 4**).

De esta forma, es necesaria la actividad de factores de transcripción del tipo *homeobox*, cuyos dominios de expresión solapan o se encuentran contenidos en el propio campo de ojo, como los genes *Hesx1* (Homeobox expressed in ES cells 1), *Six3* (*Sine oculis* homeobox homolog 3), *Six6*, *Otx2* (*Orthodenticle* homeobox 2), *Rx3* (Retinal homeobox 3) o *Pax6* (Paired box 6) (Bovolenta et al., 1998; Chuang and Raymond, 2002; Kenyon et al., 2001; Loosli et al., 1998; Lopez-Rios et al., 1999; Oliver et al., 1995; Simeone et al., 1992; Walther and Gruss, 1991; Zuber et al., 2003). También son necesarios mecanismos de señalización célula a célula, mediados por la señalización de FGF y efrinas. Concretamente, el receptor FGFR2 y efrina B1 se coexpresan en el borde del campo de ojo, y podrían regular el movimiento de las células en el mismo (Moore et al., 2004).

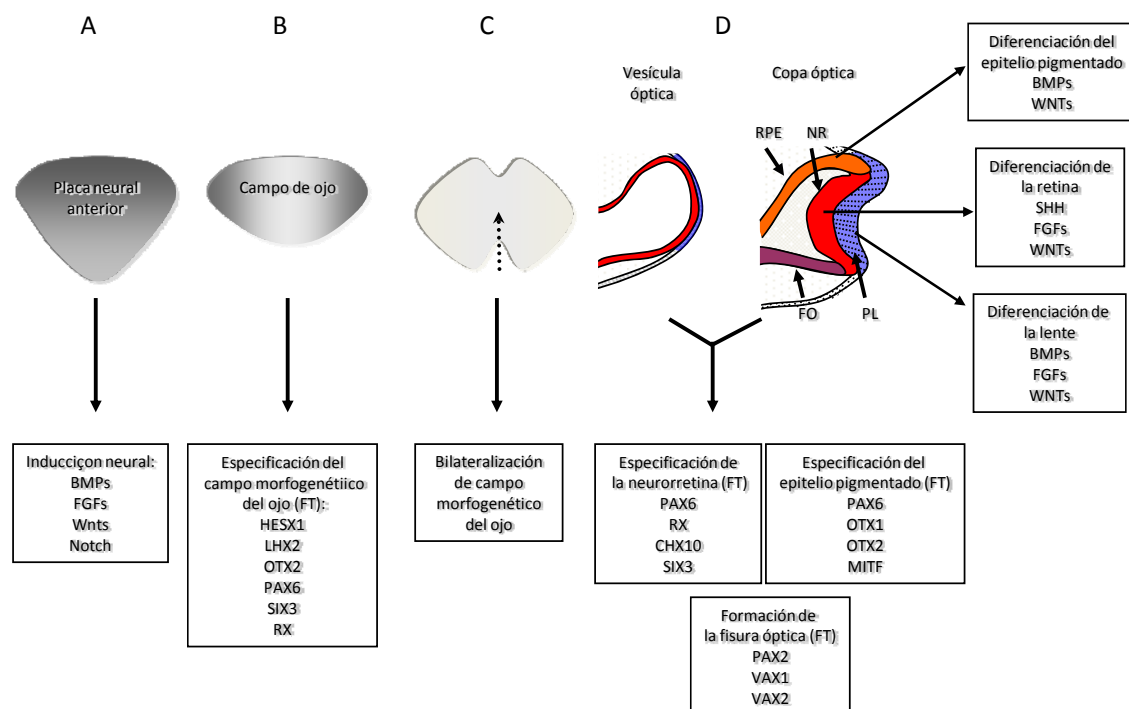


Figura 4: Resumen de moléculas implicadas en el desarrollo del ojo

La figura muestra algunas de las proteínas implicadas en su desarrollo, tanto moléculas secretables como factores de transcripción durante diferentes eventos morfogenéticos del desarrollo del ojo.

Dentro del grupo de las proteínas WNT implicadas en la especificación del campo morfogenético del ojo se encuentran: *Wnt11*, expresado en el diencefalo y en la porción posterior del campo de ojo en (Heisenberg et al., 2000) o algunos de los receptores FZ, como *Fz8* (Kim et

al., 2002; Yost et al., 1998), *Fz5* (Cavodeassi et al., 2005) o *Fz3* (Rasmussen et al., 2001; Shi et al., 1998).

Para la correcta especificación de las regiones anteriores del embrión es necesario inhibir parte de la señalización canónica de los WNT, permitiendo la regionalización de los diferentes elementos del SNC. Esto se ha evidenciado mediante el estudio de los mutantes de pez cebra *masterblind*, mutante de la *Axina1* (Heisenberg et al., 2001) o *headless*, mutante de la proteínas TCF3 (represor transcripcional de los WNT) (Kim et al., 2000). Tanto *Axina1* como TCF3 forman parte de la vía canónica y los peces mutantes de estos genes presentan defectos en la formación de los ojos por sobreactivación de esta vía. De forma inversa, la disminución de la actividad de la vía canónica mediante la sobreexpresión del inhibidor *Dkk-1*, genera ojos de mayor tamaño (Shinya et al., 2000). En concreto, se ha observado que la señalización por la vía canónica mediada por WNT8B/FZ8A, permite el correcto posicionamiento del campo de ojo. Así, mientras que la sobreactivación de esta señal inhibe la formación del campo de ojo al aumentar la actividad de la vía de la β -catenina, su inhibición expande el campo del ojo caudalmente hacia el diencéfalo anterior (Cavodeassi et al., 2005).

Los estudios realizados en el pez cebra mutante de WNT11, *silverblick*, revelan que la señal iniciada por WNT11 al unirse a FZ5 especifica el campo de ojo, necesitándose para el movimiento de las células del mesoendodermo paraxial durante la gastrulación, el mantenimiento de la coherencia de las células dentro del territorio del campo de ojo, y la modulación negativa de la señalización de WNT por la vía canónica (Cavodeassi et al., 2005; Heisenberg et al., 2000; Ulrich et al., 2005). El análisis de la función de otro miembro de las vías no canónicas, como es FZ3 de *Xenopus*, muestra que estas vías también se encuentran activas durante la especificación del campo de ojo. La sobre-expresión del receptor xFZ3 provoca la expresión ectópica de marcadores del campo morfogénico del ojo como *Pax6*, *Rx* u *Otx2*, mientras que la sobre-expresión de formas inhibitorias de FZ3 (el dominio extracelular) o de la proteína *Kermit* (que se une a FZ funcionando como un dominante negativo), provocan una disminución del tamaño de los ojos (Rasmussen et al., 2001).

4.5 Regionalización de las vesículas ópticas

Según estudios de destino celular, las células del campo de ojo se encuentran rodeadas por precursores telencefálicos, anteriormente, y diencefálicos, lateral y posteriormente. Durante la neurulación, las células del campo de ojo convergen medialmente formando un dominio único en la región anterior del cerebro prospectivo. Posteriormente, las células diencefálicas se desplazan anteriormente por debajo del campo del ojo en la región medial, mientras que los extremos laterales de la placa neural se pliegan hacia la línea media y las células telencefálicas se desplazan hasta la línea media dorsal (England et al., 2006). Además de los movimientos morfogénicos que se dan

en la placa neural anterior, las células del campo de ojo parecen contribuir de forma activa a la subsiguiente evaginación de las vesículas ópticas (Rembold et al., 2006). Aunque las señales que controlan los procesos de convergencia y la formación de las vesículas ópticas no se conocen aún, sí se sabe que el mesodermo precordial juega un importante papel (Li et al., 1997) mediante la señalización de factores de la familia de los TGF- β (transforming growth factor β), como Nodal, que podría inhibir la formación de tejido ocular en la línea media (Gripp et al., 2000; Gritsman et al., 1999; Muller et al., 2000; Sampath et al., 1998).

El crecimiento y transformación de las vesículas ópticas a copas ópticas requiere la actividad de señales externas y la actividad de diferentes factores de transcripción (Adler and Canto-Soler, 2007). En las vesículas ópticas la especificación de la NR y del RPE se determina, respectivamente, por señales originadas desde la superficie del ectodermo y del mesénquima circundante. El patrón dorso-ventral de la copa óptica se regula por un balance de señales opuestas originadas en la fisura óptica y en la región dorsal de la copa óptica.

Miembros de la familia de los FGF se expresan en la superficie del ectodermo e inducen la formación de la retina neural (Chow and Lang, 2001; Martinez-Morales et al., 2004). Además la retina neural prospectiva también expresa FGF8 y FGF9, participando en la definición del límite entre la neuroretina y el RPE (Vogel-Hopker et al., 2000; Zhao et al., 2001). Entre las moléculas importantes en la regulación del establecimiento del patrón dorsoventral se encuentran BMP4, expresado en la NR dorsal (Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Trousse et al., 2001a), o SHH, expresado en la línea media ventral (Macdonald et al., 1995; Takeuchi et al., 2003). Recientemente se ha determinado que el RPE prospectivo de las copas ópticas expresa WNT que promueven la actividad de la vía canónica en la futura NR, y que esta señalización es necesaria para regular y mantener la señal de los BMP, que a su vez mantiene la identidad de la retina neural dorsal (Veien et al., 2008).

La regionalización de las vesículas ópticas se caracteriza por la expresión diferencial de factores de transcripción, los cuales se expresan gracias a la señalización de factores secretables. En la NR prospectiva se expresan los genes *Pax6*, *Rx*, *Lhx2* (LIM homeobox) y *Chx10* (ceh-10 homeo domain-containing homolog), y en el RPE prospectivo se expresan *Pax6*, *Otx1*, *Otx2* y *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor) (Chow and Lang, 2001; Martinez-Morales et al., 2004). Entre algunos de estos factores de transcripción se establece una represión transcripcional recíproca que podría contribuir a compartimentar los territorios en la copa óptica, como PAX6 en la NR (distal) y PAX2 en el tallo óptico (proximal). Se especula que también se podría producir una represión transcripcional recíproca en el establecimiento de la regionalización dorso-ventral en la NR, con los factores PAX6-PAX2 o TBX5-cVAX (T-box transcription factor 5-Ventral anterior homeobox). El establecimiento del patrón naso-temporal de la NR requiere la expresión diferencial de otros factores de transcripción como BF1 (Forkhead box G1), BF2, SOH1 (Sensory organ homeobox protein) y GH6 (H6 family homeobox 1).

4.6 Neurogénesis de la retina

Una vez que se ha formado la copa óptica, las células de la NR presuntiva comienzan a proliferar y a diferenciarse en los distintos tipos neuronales. Los progenitores de la NR presentan movimiento nuclear intercinético, característico de los neuroepitelios (**FIG. 5A**) (Baye and Link, 2007a; Baye and Link, 2007b; Messier, 1978; Messier and Auclair, 1975; Sauer, 1935; Sauer, 1936). En las divisiones terminales de los progenitores, sus núcleos se desplazan hacia la región más apical, donde se produce la mitosis (fase M). Tras la división celular, una de las células hijas migra su núcleo hacia regiones basales del epitelio, progresando en el ciclo celular, entrando en la fase G1, dividiendo su DNA (fase S), y preparándose para una nueva mitosis (fase G2). La otra célula hija produce nuevas extensiones citoplasmáticas y desplaza su núcleo hacia las regiones más basales, donde sale del ciclo y se diferencia.

La diferenciación de los diferentes tipos neuronales de la retina se realiza de forma secuencial. En todos los vertebrados las primeras células que se diferencian son las células ganglionares (RGC) (**FIG. 5B**). Posteriormente se diferencian el resto, aunque el orden puede variar según la especie. En peces parece ser el siguiente: RGC, conos, células amacrinas, horizontales, bipolares, glía de Müller y bastones (Hu and Easter, 1999; Kitambi and Malicki, 2008; Stenkamp, 2007).

En la retina la diferenciación está desencadenada por diferentes factores secretables (Chow and Lang, 2001). Entre estos factores se encuentran miembros de la familia de los FGF secretados desde el surco óptico (Martinez-Morales et al., 2005). Las RGC recién formadas promueven a su vez la diferenciación de otras RGC a partir de los progenitores adyacentes, gracias a la señalización a corta distancia, vía SHH, en una onda neurogénica en forma de abanico, desde la región

ventronasal hasta la región dorsotemporal (**FIG. 3D**) (Neumann and Nusslein-Volhard, 2000; Shkumatava et al., 2004; Stenkamp, 2007; Wang et al., 2005). En otros vertebrados, como en el pollo

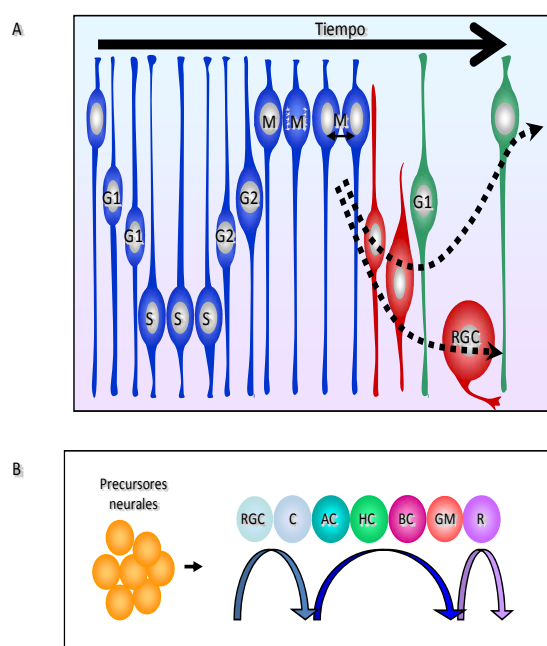


Figura 5: División y neurogénesis de la retina

A. Esquema del mecanismo de división celular en la NR, mostrándose el movimiento nuclear intercinético característico de los neuroepitelios.

B. Esquema del mecanismo de especificación neural de los diferentes tipos celulares de la retina en peces.

Abreviaturas: AC, células amacrinas, *amacrine cells*; BC, células bipolares, *bipolar cells*; C, conos, *cones*; HC, células horizontales, *horizontal cells*; M, mitosis, *mitosis*; R, bastones, *rods*; RGC, células ganglionares de la retina, *retinal ganglion cells*.

esta onda neurogénica es centrífuga desde la retina central (Prada et al., 1991).

La especificación fenotípica de los diferentes tipos celulares requiere la actividad combinada de diferentes factores de transcripción: bHLH (*basic helix loop hélix*), como ATH5 (Athonal homolog), HES (Hairy and enhancer of split), NeuroD (Neurogenic differentiation), NeuroM, NGN (neogenin homolog); factores de transcripción del tipo homeobox (como PAX6, SIX3, CRX (Cone-rod homeobox), OTX2, CHX10, RX) o factores del tipo forkhead (como FoxN4 (forkhead/winged hélix transcription factor)) (Hatakeyama et al., 2001; Li et al., 2004; Lupo et al., 2000; Ohsawa and Kageyama, 2008; Yan et al., 2005).

Algunos componentes de las vías no canónicas de los WNT parecen estar implicados en la especificación y diferenciación de las células de la NR. La interferencia de la función del receptor FZ5 en *Xenopus* mediante morfolinós reduce drásticamente la especificación y la neurogénesis del ojo (Van Raay et al., 2005).

En el extremo distal de la copa óptica se encuentra el margen ciliar (MC), estructura que formará el iris y el cuerpo ciliar posteriormente. En esta región las células expresan miembros de la vía canónica como *Wnt2*, *Fz4* y *Lef1* (Jasoni et al., 1999; Kubo et al., 2003; Liu et al., 2006). Tanto en pez cebra (Masai et al., 2005), *Xenopus* (Van Raay et al., 2005) o ratón (Liu et al., 2006), la activación de la vía canónica es necesaria para formar esta estructura. Gracias a la actividad continua de la vía canónica, las células mantienen un estado indiferenciado, inhibiendo la expresión de genes proneurales, y proliferativo, permitiendo, al menos en peces y en anfibios, la incorporación de nuevas células a la NR (Cho and Cepko, 2006; Denayer et al., 2008; Kubo et al., 2005).

La diferenciación conlleva el posicionamiento de las células en diferentes capas confiriendo el aspecto laminado de la NR (**FIG. 3E**). La capa más interna la conforman las RGC y una población de células amacrinas desplazadas; después se encuentra una capa intermedia denominada capa nuclear interna, formada por los somas de las células amacrinas, bipolares, horizontales y glía de Müller. Por último, se encuentra la capa nuclear externa, formada por los somas de los fotorreceptores. A medida que las células van diferenciando, se van produciendo las interconexiones neuronales entre las células para el correcto funcionamiento del ojo.

Durante la laminación de la retina es necesaria la actividad de la vía canónica de los WNT. Las retinas de ratones con inactivación condicional de la β -catenina no se laminan, al afectarse la migración de las células diferenciadas y su posicionamiento dentro en la NR. Sin embargo, ni la neurogénesis ni la especificación de los diferentes tipos neuronales se altera en estos ratones (Fu et al., 2006). La señalización iniciada por WNT2B parece ser esencial en este proceso: las retinas de *Xenopus* en los que se sobreexpresa WNT2B se desorganizan (Ladher et al., 2000) y reagregados de células disociadas de NR forman estructuras laminadas al añadirse WNT2B (Nakagawa et al., 2003).

4.7 Guía axonal en la vía visual

La información visual se transmite desde el ojo hasta el cerebro por medio de los axones de las RGC. Las conexiones entre ambas estructuras se establecen durante el desarrollo mediante el crecimiento axonal por una ruta determinada denominada vía visual (Erskine and Herrera, 2007). Los axones de las RGC que se diferencian crecen por la superficie interna de la retina hacia el punto de salida del ojo, el disco óptico. Desde allí, los axones salen fuera del ojo constituyen el nervio óptico que se extiende hacia la región medial del diencefalo ventral. En este lugar se encuentran los axones provenientes de ambos ojos configurando una estructura en forma de “x” denominada quiasma óptico. Mientras que las proyecciones axonales en peces y anfibios son todas contralaterales (los axones de cada ojo proyectan al lado contrario del cerebro), en humanos y ratón aparecen también proyecciones ipsilaterales. Posteriormente, los axones de las RGC crecen dorsalmente por los tractos ópticos hasta sus dianas en el cerebro: el techo óptico (TO) en peces, anfibios y aves, o el núcleo geniculado lateral (LGN, *lateral geniculate nucleus*) y el colículo superior en mamíferos. La ruta finaliza cuando los axones reconocen y forman sinapsis con las células diana apropiadas.

La capacidad de los axones de las RGC para alcanzar sus dianas viene dada por una estructura especializada en su extremo más distal denominada cono de crecimiento (Erskine and Herrera, 2007). Los conos de crecimiento son estructuras de gran motilidad, capaces de formar filopodios y lamelipodios, que actúan como verdaderos órganos sensoriales. Los conos son capaces de detectar y responder a las diferentes moléculas guía las cuales controlan el crecimiento del axón (**FIG. 7**). Estas moléculas pueden encontrarse de forma soluble, en el medio extracelular, o ancladas en la membrana plasmática de otras células. La respuesta que las moléculas guía provocan sobre el cono de crecimiento puede ser atractiva, promoviendo el crecimiento del axón hacia una región determinada, o repulsiva, si dirigen el crecimiento en dirección contraria a la fuente de las moléculas guía. En algunos casos, estas moléculas pueden producir diferentes repuestas sobre las mismas neuronas. En la superficie de los conos de crecimiento existen receptores, que son activados por sus ligandos e inducen una cascada de señalización capaz de provocar cambios en la organización del citoesqueleto, y consecuentemente, en el crecimiento axonal. Algunas moléculas de guía axonal se expresan formando gradientes, tanto en la NR como en el TO, que permiten que los niveles de proteínas se traduzcan en valores posicionales que controlan las proyecciones retinotectales en los ejes anteroposterior y dorsoventral. De esta forma, mientras que los axones de las RGC dorsales crecen hasta la región ventral (lateral) del TO, los axones procedentes de la retina ventral de la retina lo hacen hasta la región dorsal (medial) del TO. Por otra parte, los axones de las RGC de la retina nasal se conectan a la región posterior del TO mientras que los axones provenientes de la retina temporal inervan la región anterior del TO.

En los últimos años se han identificado diferentes familias de proteínas evolutivamente conservadas con funciones de guía axonal. Algunos ejemplos de estas familias que componen sistemas ligando-receptor son las efrinas/Eph (McLaughlin et al., 2003; O'Leary and McLaughlin, 2005), netrinal/Dcc/UNC5 (Barallobre et al., 2005; Hopker et al., 1999; Mann et al., 2004), slits/robo (Erskine et al., 2000; Plachez et al., 2008; Plump et al., 2002; Thompson et al., 2006a; Thompson et al., 2006b) o semaforinas/neuropilinas/plexinas (Fujisawa, 2004).

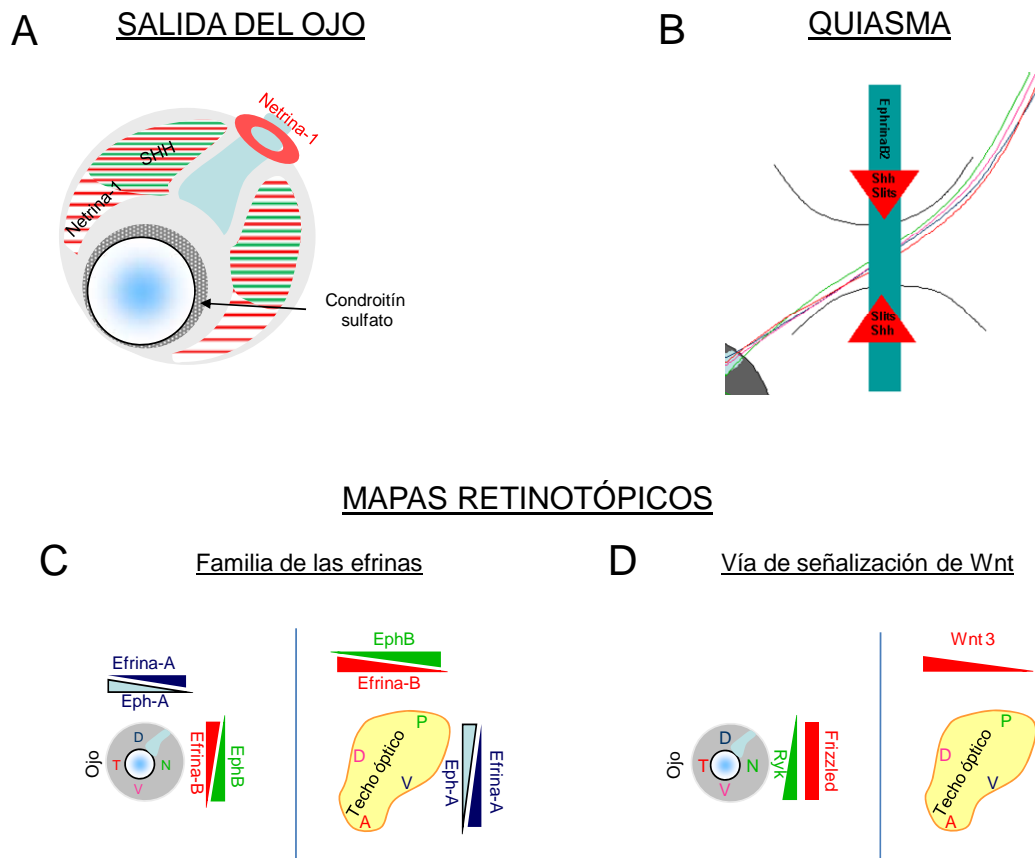


Figura 6: Puntos clave de la acción de las moléculas guía a lo largo de la vía visual

Las moléculas guía actúan en diferentes puntos clave de la vía visual: en la retina y la salida por el nervio óptico (**A**), por el quiasma óptico, lugar por el que los axones cruzan en su camino al cerebro (**B**), y en el techo óptico en donde se pueden establecer los mapas retinotópicos por la expresión en gradiente de moléculas guía y sus receptores en el techo óptico y en la retina (**C-F**)

Abreviaturas: A, anterior; D, Dorsal; N, Nasal; P, Posterior; Ryk, Receptor tyrosine kinase; Shh, Sonic hedgehog; T, Temporal; V, Ventral.

También se ha descrito que determinadas proteínas secretables, cuya función como morfógenos durante el desarrollo es bien conocida, funcionan como moléculas de guía axonal (Bovolenta, 2005; Sanchez-Camacho et al., 2005; Zou and Lyuksyutova, 2007). Entre ellas se

encuentra SHH (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Trousse et al., 2001b), o miembros de las familias de FGF (Bovolenta, 2005; McFarlane et al., 1995) o WNT (Luo, 2006; Schmitt et al., 2006). Concretamente, nuestro laboratorio ha demostrado que SFRP1, uno de los moduladores descritos del mecanismo de señalización de WNT, es capaz de funcionar como molécula de guía axonal de las RGC, activando una señal de forma independiente de WNT, mediante la activación directa del receptor FZ2 (Rodriguez et al., 2005).

4.8 Los SFRP (Secreted Frizzled Related Proteins)

Dentro del grupo de moduladores de la señalización de los WNT se encuentran las proteínas SFRP (Secreted Frizzled Related Proteins). El primer miembro que se encontró, FRZB (SFRP3) fue descubierto como un factor condrogénico asilado en cartílago (Hoang et al., 1996) y también como resultado de la búsqueda de factores dorsalizantes en *Xenopus* (Bouwmeester et al., 1996) capaz de unirse a WNT8 bloqueando su señalización (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997a; Wang et al., 1997b). Posteriormente, se han caracterizado el resto de miembros de la familia de los SFRP, en algunos casos por su similitud a la secuencia de los receptores FZ (Rattner et al., 1997); por purificaciones con factores que unían los SFRP como HBFG/SC (heparin binding factor hepatocyte growth factor/scattered factor) (Finch et al., 1997) y en otros casos, en un contexto ajeno a la señalización de los WNT, siendo relacionados con la apoptosis (Melkonyan et al., 1997).

4.8.1 Estructura de los SFRP

Los SFRP presentan una estructura proteica modular con dos dominios característicos (Chong et al., 2002). En el extremo amino terminal tiene un péptido señal de secreción seguido de

un dominio rico en cisteínas (CRD) y en el extremo carboxilo terminal un dominio tipo netrina (NTR) (**FIG. 7**). Ambos dominios se encuentran muy conservados en la evolución y presentan

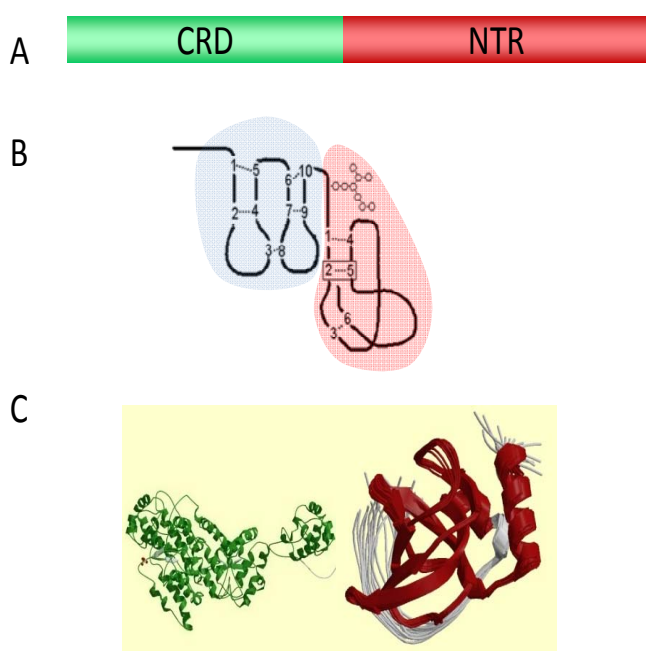


Figura 7: Estructura bimodular de los SFRP

- A. Esquema de la estructura de los SFRP. En verde el dominio CRD y en rojo en dominio NTR.
- B. Esquema de la estructura de los SFRP mostrando la posición de los puentes de disulfuro intra-catenarios (Chong et al., 2002).
- C. Modelo de la estructura terciaria de SFRP1, remarcando cada uno de los dominios.

en su secuencia un patrón de cisteínas conservadas que forman puentes de disulfuro intracatenarios (Chong et al., 2002).

El dominio CRD se caracteriza por poseer 10 cisteínas que forman 5 puentes de disulfuro intracatenarios y también se encuentra presente en el fragmento extracelular de los receptores FZ, proponiéndose como el dominio de unión de las proteínas WNT (Bafico et al., 1999; Dann et al., 2001; Lin et al., 1997). Otras proteínas que presentan este dominio son los receptores tirosina quinasa ROR, el transductor de la señal de SHH *Smoothed*, la carboxipeptidasa Z o una isoforma del colágeno XVIII (Rehn and Pihlajaniemi, 1995; Saldanha et al., 1998; Song and Fricker, 1997; Xu and Nusse, 1998).

Tras el dominio CRD, y separados por una pequeña región de unión entre ambos, se encuentra el dominio NTR, caracterizado por presentar una serie de bloques de residuos aminoacídicos hidrofóbicos y 6 residuos de cisteínas. Este dominio se encuentra presente en otras proteínas como la Netrina1, las proteínas del complemento C3, C4, y C5, los inhibidores de proteasas TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases) o las proteínas POLCE (Procollageno C-proteinase enhancer proteins) (Banyai and Patthy, 1999). Mientras que los dominios NTR de SFRP1, SFRP2 y SFRP5 comparten el mismo patrón de cisteínas similar al de la Netrina1, el subgrupo de SFRP4 y SFRP5 lo varía, cambiando el patrón de puentes de disulfuro (Chong et al., 2002). En estas proteínas el extremo carboxilo terminal posee una serie de segmentos con aminoácidos cargados positivamente que confieren a los SFRP la capacidad de unión a heparina (Uren et al., 2000).

Los SFRP pueden sufrir diferentes modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones o sulfataciones, lo que podría conferir diferentes capacidades funcionales a los miembros de esta familia (Chong et al., 2002; Zhong et al., 2007). En concreto, la sulfatación de SFRP1 es inhibida por su unión a heparina, y desestabiliza parcialmente la proteína (Zhong et al., 2007).

4.8.2. La familia de proteínas SFRP

La familia de los SFRP comprende 5 miembros en humanos. Los análisis filogenéticos realizados indican que SFRP1, SFRP2 y SFRP5 se encuentran muy cercanos entre ellos y que divergen de SFRP3 y SFRP4 que, en cambio, están relacionados entre ellos. Esta separación en dos grupos se refleja también en la organización genómica que presentan; mientras que SFRP1, SFRP2, y SFRP5 presentan tres exones cada uno (Garcia-Hoyos et al., 2004), SFRP3 y SFRP4 tienen seis exones. En todos los vertebrados que se han analizado se han encontrado ortólogos de todos los miembros de esta familia. De forma relevante, en *Xenopus*, pez cebra y pollo, aparece un tercer subgrupo compuesto por las proteínas Sizzled, Crescent and Tlc, que tienen similitudes en sus secuencias con el subgrupo de SFRP1-SFRP2-SFRP5, caracterizándose por tener un patrón de expresión muy restringido durante la gastrulación en la región anterior de los embriones (Bradley et

al., 2000; Collavin and Kirschner, 2003; Chapman et al., 2004; Houart et al., 2002; Pfeffer et al., 1997; Salic et al., 1997; Yabe et al., 2003). El resto de miembros de la familia se expresan de forma amplia a lo largo de todo el desarrollo en el embrión.

Hasta la fecha, no se han encontrado homólogos de los SFRP en *Drosophila*, aunque sí en otros invertebrados como el erizo de mar, (Lapraz et al., 2006), el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la ascidia *Ciona intestinalis* (Hino et al., 2003) y la esponja *Lubomirskia baicalensis* (Adell et al., 2007). Además, el erizo de mar expresa una proteína relacionada a los SFRP que contiene un péptido señal, cuatro dominios CRD y un dominio del tipo inmunoglobulina, aunque carece del dominio NTR (Illies et al., 2002).

4.8.3 Funciones de los SFRP

Las investigaciones llevadas a cabo sobre estas proteínas han revelado parte de los mecanismos de acción por los que funcionan durante el desarrollo o en diferentes enfermedades (Bovolenta et al., 2008; Cadigan and Liu, 2006; Jones and Jomary, 2002; Kawano and Kypta, 2003). Además de actuar como inhibidores de los WNT, podrían realizar otras funciones. Se ha descrito que son capaces de neutralizarse unos a otros (Yoshino et al., 2001), de unirse directamente a los receptores FZ (Bafico et al., 1999; Rodriguez et al., 2005) o de funcionar como moléculas de guía axonal (Rodriguez et al., 2005). También hay que sumar la capacidad que tienen de unirse a otras moléculas no relacionadas directamente con el mecanismo de señalización de los WNT, como la fibronectina (Lee et al., 2004), el ligando de RANK (Receptor activator of NF- κ B ligand) (Hausler et al., 2004); o de actuar como inhibidores de proteasas, interfiriendo la señalización de los BMP (Yabe et al., 2003; Lee et al., 2006a; Muraoka et al., 2006) (Lee et al., 2006a). La capacidad de unión de SFRP1 al motivo aminoacídico DRG, que aparece contenido en la proteína UNC5H3 (receptor de la netrina1) podría tener implicaciones en guía axonal (Chuman et al., 2004).

Los SFRP son necesarios en el control de la homeostasis celular, y se ha observado que presentan alteraciones de su expresión en diferentes procesos tumorigénicos (Rubin et al., 2006), enfermedades del hueso (Bodine and Komm, 2006), degeneración retiniana (Jones et al., 2000) o enfermedades metabólicas (Berndt and Kumar, 2007).

Parte de las funciones de los SFRP podrían explicarse por la estructura bimodular que presentan, debido a la capacidad de unión a otras proteínas por cada uno de los dominios, lo que ha llevado a proponer diferentes mecanismos de acción de estas proteínas (**FIG. 8**) (Bovolenta et al., 2008). La propuesta inicial es que el dominio CRD de los SFRP se une a WNT impidiendo la unión de WNT al receptor FZ. Nuestro laboratorio ha determinado mediante inmunoprecipitaciones que el dominio NTR de SFRP1 es capaz de unirse a WNT8, mientras que el dominio CRD se une al receptor FZ5. Por otro lado, los ensayos de sobreexpresión realizados en oocitos de pez *medaka* muestran que el dominio NTR de SFRP1 tiene funciones similares a la proteína completa y rescata

el fenotipo de sobreexpresión de WNT. Estos datos sugieren que la inhibición por parte de SFRP1 de la señalización canónica de WNT en la placa neural anterior podría ser llevada a cabo por la unión con el dominio NTR (Lopez-Rios et al., 2008a).

Nuestro laboratorio también ha observado que SFRP1 puede unirse directamente al receptor FZ2 promoviendo una respuesta en el cono de crecimiento de las RGC (Rodriguez et al., 2005). El mecanismo podría implicar algunos componentes de las vías no canónicas, puesto que la actividad neuritogénica de las RGC en cultivo se modifica como respuesta a tratamientos farmacológicos que promueven cambios en la concentración de cGMP (GMP cíclico) intracelular o por la inhibición parcial de la CamKII (Rodriguez et al., 2005); y tanto el cGMP como el Ca^{2+} se enmarcan en la señalización iniciada por la activación de FZ2 (Kuhl, 2004).

Otra posibilidad es que puedan funcionar como transportadores de los WNT, uniéndose por cada dominio tanto a WNT como al receptor FZ y facilitando el inicio de la cascada de señalización.

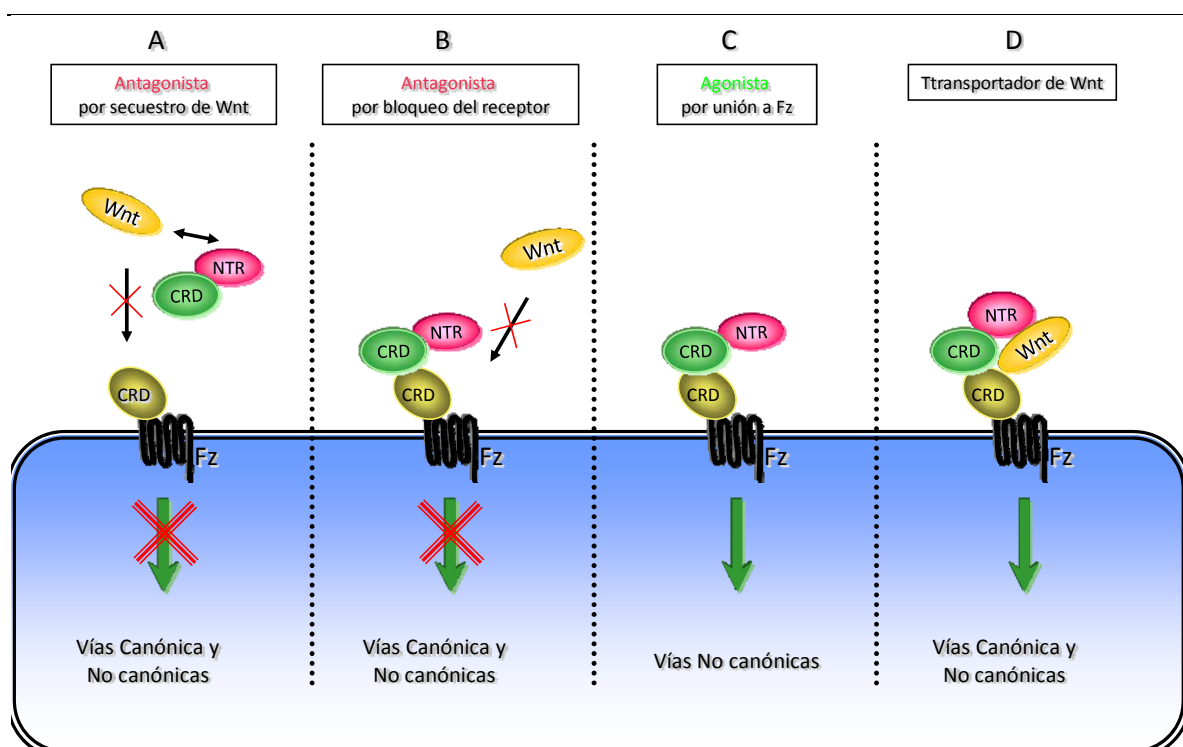


Figura 8:

Modelos propuestos del mecanismo de acción de los SFRP (Bovolenta et al., 2008)

- Antagonistas de la señalización de WNT por secuestro de éstas, lo que se traduce en una reducción de las actividades de la ruta canónica y de las no canónicas.
- Antagonistas de la señalización de WNT por bloqueo del receptor que se traduce en una reducción de las actividades de la ruta canónica y de las no canónicas.
- Agonista de la señalización de WNT por unión al receptor y activación de las rutas no canónicas.

4.8.4 SFRP durante el desarrollo del ojo

El interés de nuestro laboratorio es determinar los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo temprano del ojo. Mediante una búsqueda en una librería de substracción de cDNA, se aisló *Sfrp1* de pollo y su patrón de expresión indicaba que podía jugar un papel importante durante el desarrollo del ojo (Esteve et al., 2000). Como se comentó con anterioridad, la señalización de WNT contribuye a la regionalización de la placa neural anterior, requiriendo una contribución de la ruta canónica y las rutas no canónicas, y cuya modulación por los SFRP puede ser fundamental. Tanto en pollo como en *medaka* *Sfrp1* se expresa en la placa neural anterior. Estudios realizados en el pez *medaka* indicaron que SFRP1 es fundamental en el establecimiento del campo morfogenético del ojo. La interferencia de la función mediante morfolinós reduce el dominio de expresión de marcadores del campo de ojo. Además, los embriones presentaban una reducción del eje antero-posterior, y una expansión de los marcadores telencefálicos, indicando que SFRP1 es necesario en la segregación de los territorios de ojo y de telencéfalo durante la formación del cerebro anterior (Esteve et al., 2004).

A medida que la NR se desarrolla, *Sfrp1* se expresa en un gradiente centrop periférico, y contribuye a la neurogénesis con un mecanismo que no requiere de la activación de la vía de la β -catenina, actuando como una señal de diferenciación sobre el conjunto de progenitores neurales de la retina. En ensayos de sobreexpresión de *Sfrp1* por infecciones de retrovirus en retinas de pollo se observaba que aumenta el número de RGC y conos, y una disminución del número de células horizontales (Esteve et al., 2003).

Los patrones de expresión de otros miembros de la familia de los SFRP, como *Sfrp2* en ratón en la NR (Liu et al., 2003), o *Sfrp5*, localizado en el RPE (Chang et al., 1999) indican que pueden tener funciones relevantes durante el desarrollo temprano del ojo. El estudio de estas funciones permitirá aclarar parte del funcionamiento del mecanismo de señalización de los WNT.

5. OBJETIVOS

El estudio de la formación de los ojos durante el desarrollo embrionario es uno de los ejes central del trabajo de nuestro laboratorio. En concreto, estamos interesados en conocer cómo diferentes mecanismos de señalización contribuyen al desarrollo temprano del ojo. Uno de los mecanismos de señalización que más se ha estudiado, y que es necesario en múltiples procesos del desarrollo, es el que está mediado por las proteínas secretables WNT. Estas proteínas presentan un entramado de señalización muy complejo, y nuestro laboratorio ha realizado importantes aportaciones en cuanto al conocimiento de la regulación de la señal mediada por los WNT al estudiar las funciones de los SFRP. Los SFRP comprenden una familia de proteínas secretables capaces de inhibir a los WNT al unirse directamente a ellos, o capaces de unirse a los receptores de los WNT, los FZ, para iniciar una cascada de transducción de señales. Nuestro laboratorio ha determinado que *Sfrp1* es necesario durante diferentes momentos del desarrollo de los ojos, y los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral se centran en el estudio de uno de los miembros de los SFRP en el pez *medaka*, durante el desarrollo de los ojos. El pez *medaka*, al igual que el pez cebra, es un sistema modelo muy accesible que permite realizar análisis funcionales de genes de forma rápida y sencilla. La existencia de duplicaciones génicas en los peces teleósteos nos llevó a buscar una posible duplicación del gen *Sfrp1* en el pez *medaka*. Aunque no encontramos la duplicación de este gen, sí encontramos otro miembro de esta familia con una alta homología de secuencia y que identificamos como *olSfrp5*, y cuyo patrón de expresión auguraba un papel relevante durante el desarrollo de los ojos. Como parte de esta Tesis Doctoral nos propusimos los siguientes objetivos encaminados a estudiar su función:

- 1. Caracterización del patrón de expresión de *olSfrp5* durante el desarrollo embrionario**
- 2. Estudio de la función de *olSfrp5* durante la especificación y diferenciación del ojo**
- 3. Estudio de la posible función de *olSfrp5* y *olSfrp1* en guía axonal**

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Modelos animales: pez *medaka*

La colonia de peces fue mantenida en las dependencias del animalario del Instituto Cajal, CSIC. Los sistemas de acuarios son de agua dulce, con temperatura constante de 28° C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. El mantenimiento de los sistemas fue llevado a cabo por D. Isidro Dompablo García.

La colonia de pez *medaka*, *Oryzias latipes*, de la cepa *Cab*, provenía originalmente del laboratorio del Dr. Jochen Wittbrodt, EMBL, Heidelberg (Alemania). De la misma forma también nos cedió la cepa mutante *Heino* (mutación proveniente de la cepa *Kaga*), carente de pigmentación.

La línea transgénica *olAth5::eGFP* fue generada en la cepa mutante *Henio* por Dr. Filippo Del Bene, en el laboratorio del Dr. Jochen Wittbrodt, EMBL, Heidelberg (Alemania) (Del Bene et al., 2007). Esta cepa (*olAth5::eGFP*) fue cruzada con la cepa *Cab* para generar una nueva colonia de peces en el Instituto Cajal.

Los estadios embrionarios se determinaron según Iwamatsu (Iwamatsu, 2004).

6.2 Clonación de *Sfrp5* de *medaka* (*olSfrp5*)

Gracias a las secuencias disponibles relacionadas a *olSfrp1* presentes en las bases de datos de *Oryzias latipes* (*medaka*) (<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka>), y mediante comparación con las secuencias genómicas de otros peces, como el pez *fugu* o pez globo, *Fugu rubripes* (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>), el pez cebra, *Danio rerio* (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html) y el pez globo verde, *Tetraodon nigroviridis* (<http://www.genoscope.cns.fr/extreme/tetranew>), se diseñaron una batería de oligonucleótidos que cubrían la supuesta región codificante del gen *olSfrp1* en *medaka* (Tabla 1).

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en el clonaje del cDNA de *olSfrp5*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'→3')
<i>olSfrp5</i> Directo 1	KMSGAGTAVGACTACTAVAGC
<i>olSfrp5</i> Directo 2	ATACGACCTTCTTGAATTGC
<i>olSfrp5</i> Directo 3	CATGGCGCATGGACAAAAGAGC
<i>olSfrp5</i> Directo 4 (ATG)	TGTTCTGAACTCAGAGAGGCATGGCAC
<i>olSfrp5</i> Reverso 1	TAGTAACAGGTTTAAACTGG
<i>olSfrp5</i> Reverso 2	TAGACGGGCKGTCCAGRCA

Se recogieron embriones de pez *medaka* en estadios de vesícula y copa óptica (19 y 20, respectivamente), se extrajo RNA total con **TRIZOL® Reagent** de **GibcoBRL** mediante un protocolo estándar y se retrotranscribió para obtener el cDNA utilizando **SuperScriptII™ Reverse Transcriptase** de **Invitrogen™** con el protocolo del fabricante. Se amplificaron los fragmentos de cDNA mediante PCR utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 92°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 92°C durante 20s, anillamiento a

58°C durante 60s y elongación a 68°C durante 90s, y por último, elongación final a 68°C durante 7 min.

Los fragmentos generados se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa, se purificaron utilizando el kit de **GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit** de **Amersham Pharmacia Biotec** y se clonaron en un vector de clonación de fragmentos generados por PCR, el **pGEM®-T Vector System** de **Promega**. Las ligaciones se transformaron mediante choque de calor en bacterias DH5α competentes para transformación química, se plaquearon en placas de LB-agar con ampicilina, y se seleccionaron los clones que contenían vector e inserto por el sistema X-Gal/IPTG. Estos clones se crecieron individualmente y sus plásmidos se purificaron mediante el kit **Jet Quick Plasmid Miniprep Spin** de **Genomed**. La secuenciación fue efectuada por **Secugen S.L.**

6.3 Estudio filogenético

Las secuencias utilizadas para el análisis filogenético con sus correspondientes números de acceso disponibles de diferentes especies de las bases de datos del **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del **EMBL** (<http://www.ensembl.org/index.html>) se indican en la **tabla 2**.

El análisis de las secuencias para construir el árbol filogenético y el estudio de los dominios de las proteínas, se realizó con dos paquetes de programas disponibles en Internet de forma gratuita, el de **GeneBee, Molecular Biology Server**, con la herramienta **TreeTop-Phylogenetic Tree Prediction** (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>) y el de **EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute** con la herramienta **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Las secuencias correspondientes al péptido señal se definieron mediante el programa en línea <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Emanuelsson et al., 2007). El árbol filogenético se construyó mediante el software de **TreeTop-Phylogenetic Tree Prediction (GeneBee Service)**. La comparación de secuencias se realizó mediante una matriz *Dayhoff* y el árbol se construyó mediante un algoritmo topológico.

La edición de las secuencias de ADN y proteínas se realizó utilizando los programas **Microsoft® Word® 2007** y **BioEdit-Sequence-Alignment-Editor®7.0.5.3**. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Tabla 2: Secuencias utilizadas en la realización del estudio filogenético de las proteínas SFRP.

Género y especie	Abreviatura	Gen	Número de acceso del NCBI HomePage y link
<i>Ambystoma mexicanum</i>	<i>a</i>	<i>Sizzled</i>	AAK58842
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>ce</i>	<i>Sfrp</i>	NP_500977
<i>Ciona intestinalis</i>	<i>ci</i>	<i>Sfrp1-5</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3-4^a</i> <i>Sfrp3-4b</i>	NP_001071964 NP_001072004 NP_001071812 NP_001071813
<i>Danio rerio</i>	<i>z</i>	<i>Sfrp1a</i> <i>Sfrp1b</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3</i> <i>Sfrp5</i> <i>Sizzled</i> <i>Tlc</i>	AAH92673 AAI54249 AAI24708 NP_571018 AAH85455 AAO34663 AAM92772
<i>Fugu rubripes</i>	<i>f</i>	<i>Sfrp5</i>	NEWSINFRUP00000135897
<i>Gallus gallus</i>	<i>c</i>	<i>Sfrp1</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3</i> <i>Sfrp5</i> <i>Crescent</i> <i>Sizzled</i>	NP_989884 AAF27642 NP_990103 XP_421707 NP_990430 XP_415985
<i>Homo sapiens</i>	<i>h</i>	<i>Sfrp1</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3</i> <i>Sfrp4</i> <i>Sfrp5</i>	NP_003003 AAH08666 AAB51298 NP_003005 AAB70794
<i>Lubomirskia baicalensis</i>	<i>lb</i>	<i>Sfrp</i>	CAJ77473
<i>Mus musculus</i>	<i>m</i>	<i>Sfrp</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3</i> <i>Sfrp4</i> <i>Sfrp5</i>	AAC53145 AAH14722 AAC53147 AAD12306 NP_061250
<i>Oryzia latines</i>	<i>o</i>	<i>Sfrp1</i> <i>Sfrp5</i>	AAS59408 Secuencia aislada objeto de estudio
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	<i>sp</i>	<i>SfrpA</i> <i>SfrpA'</i> <i>SfrpA''</i>	XP_781087 XP_786860 NP_999672
<i>Tetraodon nigrividis</i>	<i>tn</i>	<i>Sfrp5</i>	CAF98709
<i>Xenopus laevis</i>	<i>x</i>	<i>FrzA</i> <i>Sfrp2</i> <i>Sfrp3</i> <i>Sfrp5</i> <i>Sizzled</i> <i>Crescent</i>	AAD02492 AAH44687 AAC60113 AAN87352 AAF70340 AAC15063
<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>xt</i>	<i>Sfrp5</i>	AAH74661

6.4 Clonación de la región 5' no traducida de *olSfrp5* de *medaka*

El análisis de regiones de secuencias conservadas de la región 5' no traducida (UTR) del gen *Sfrp5* entre diferentes especies de peces nos permitió buscar en la base de datos de DNA genómico del pez *medaka* secuencias en las que diseñar oligonucleótidos para la clonación de la región 5' no traducida del mRNA de *olSfrp5*.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos basándonos en las secuencias de la base de datos de DNA genómico de *medaka* depositadas en el NIG-DNA Sequencing Center (<http://dolphins.lab.nig.ac.jp/medaka/index.php>). Los números de acceso de las secuencias genómicas que incluyen el gen *olSfrp5* que se utilizaron fueron: *medaka*-200406-scaffold8400, *medaka*-200406-scaffold12971.

Tabla 3: Oligonucleótidos específicos diseñados para clonar el 5'UTR de *olSfrp5* de *medaka*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'→3')
5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso1 A	CTTGATTTTCATCTTCAGGA
5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso 1 B	ACCTCCTTGATTTTCATCTTC
5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso 2	ACTCCCTGCTTCAAACCTTC
5'UTR <i>olSfrp5</i> Directo 1	TTGTGAGGGCAAAGCAGGAG
5'UTR <i>olSfrp5</i> Directo 2	ACTTGTTTGCTCACACATCCC
5'UTR <i>olSfrp5</i> Directo 3	TTGTTCGTAGCTCAATTGTTC
5'UTR <i>olSfrp5</i> Exón 2 Reverso	GTAATGCTCCATGATGTTGTC
5'UTR <i>olSfrp5</i> Exón 2 Reverso 2	TTCAGCTCGTTGTACATGGT

Se utilizó cDNA de estadio 19 y 20, y utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos (**tabla 4**) se realizaron diferentes PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 92°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 92°C durante 10s, anillamiento a 55°C durante 60s y elongación a 72°C durante 70s, y por último, elongación final a 72°C durante 7 min. Los fragmentos generados, se clonaron en el vector de clonación de productos de PCR (pGEM-T) y se secuenciaron, tal y como se describió anteriormente.

Tabla 4: Combinaciones de oligonucleótidos y productos generados en la clonación de 5' UTR de *olSfrp5*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'→3')	PRODUCTO (pb)
<i>olSfrp5</i> Directo 1	5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso 1 B	974
<i>olSfrp5</i> Directo 1	5'UTR <i>olSfrp5</i> Exón 2 Reverso 2	909
<i>olSfrp5</i> Directo 2	5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso1 A	906
<i>olSfrp5</i> Directo 2	5'UTR <i>olSfrp5</i> Reverso 1 B	910
<i>olSfrp5</i> Directo 2	<i>olSfrp5</i> Reverso 2	980
<i>olSfrp5</i> Directo 2	5'UTR <i>olSfrp5</i> Exón 2 Reverso	870
<i>olSfrp5</i> Directo 2	5'UTR <i>olSfrp5</i> Exón 2 Reverso 2	845

6.5 Morfolinos

Los morfolinos (oligonucleótidos modificados en antisentido) que se utilizaron se adquirieron a **GeneTools, LLC, (OR, USA)** y se diseñaron basándonos las secuencias obtenidas que habíamos clonado anteriormente de la región del 5'UTR de *olSfrp5*.

6.5.1 Morfolinos para *olSfrp5*

Para el gen *olSfrp5* se diseñaron 2 morfolinos (**Tabla 5**) en función de los parámetros recomendados por la compañía que los fabrica: que estén situados en torno a la posición -25, que tengan entre un 40 y un 60% de bases G o C, y que no den lugar a estructuras secundarias. El morfolino “A” (MoA) se diseñó a 9 pares de bases del ATG que codifica para la metionina iniciadora. El morfolino “B” (MoB) se diseñó a 18 pares de bases del ATG inicial, gracias a las nuevas secuencias de las que se disponía tras la clonación de la región 5’ no traducida del gen. Ambos morfolinos presentaban todos los parámetros recomendados por la compañía. Se diseñó un morfolino con 5 cambios en la secuencia (MoMissB) como control de especificidad del MoB (que era más eficiente para reducir la función de *olSfrp5*).

Tabla 5: Morfolinos para *olSfrp5*. En gris se muestran las variaciones de la secuencia con respecto al morfolino control, 5 cambios como recomienda el fabricante.

MORFOLINO	SECUENCIA (5’→3’)
MoA	GTTCAGAACAGCAATTCAAGAAGGT
MoB	CAGCAATTCAAGAAGGTTGTATCCA
MoMissMoB	CACCAATTGACGAAGGCTCTATCCA

6.5.2 Morfolinos de *Sfrp1* de *medaka*

Para el gen *olSfrp1* se utilizaron los morfolinos que habían sido diseñados por el Dr. Javier López Ríos y la Dra. Pilar Esteve (Esteve et al., 2004) (**Tabla 6**). El morfolino de *olSfrp1* (Mo1) se encuentra localizado a 30 pares de bases del triplete iniciador. Como control se utilizó el morfolino que portaba 5 bases diferentes al anterior.

Tabla 6: Morfolinos para *olSfrp1* en gris se muestran las 5 variaciones de la secuencia con respecto al morfolino control.

MORFOLINO	SECUENCIA (5’→3’)
Mo1	CTGTGTTTGTAGGAACCTCGACTGG
MoMiss1	CTCTGTTTCTAGCAACGTGGAGTGG

6.5.3 Generación del mRNA control del morfolino de *olSfrp5*

Para determinar la eficiencia del morfolino contra *olSfrp5* se generó un mRNA control que constaba de 266 pares de bases del 5’ UTR de *olSfrp5*, las primeras 48 pares de bases del gen, y manteniendo la misma pauta de lectura, la secuencia codificante de la GFP citoplasmática.

La clonación de estas secuencias se realizó el vector pCS2+. De forma resumida la estrategia de clonación se estableció mediante dos PCR, cuyos oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 7**. En la primera se extrajo la secuencia de la GFP (772 pb) de un vector cedido amablemente por el laboratorio del Dr. J. Wittbrodt, utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 92°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación:

desnaturalización a 92°C durante 30s, anillamiento a 60°C durante 30s y elongación a 72°C durante 60s, y por último, elongación final a 72°C durante 7 min. La segunda PCR generó un producto que portaba parte del 5' UTR y de la región codificante de *olSfrp5*, añadiendo la secuencia de la diana de restricción Eco R-I (334 pb); las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial 92°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 92°C durante 30s, anillamiento a 60°C durante 30s y elongación a 72°C durante 60s, y por último, elongación final a 72°C durante 7 min.

Ambos fragmentos generados se clonaron en un vector pCR2.1® (**Topo® Cloning, Invitrogen™**) para productos de PCR, y desde allí se clonaron en el pCS2+ aprovechando una diana de restricción interna Sac-I del 5' UTR y de la GFP para mantener la pauta de lectura en la traducción con los 16 primeros aminoácidos de *olSfrp5*.

Tabla 7: Oligonucleótidos para la clonación del constructo que generará el mRNA control para probar la eficiencia de los morfolinós de *olSfrp5*.

PRIMER	SECUENCIA (5'→3')
T7	GTAATACGACTGACTATAG
Directo <i>GFP</i>	AGCTTGCGAGCTCCATGGTGAG
Directo ECORI 5' UTR	GCCCGCCTGCTGCTTGAATTC
5' UTR <i>olSfrp5</i> Reverso 2	ACTCCCTGCTTCAAAACCTTC

El constructo final pCS2+-5'UTR*olSfrp5*-GFP, se cortó con la enzima de restricción Apa-I. Se purificó la digestión y se generó el mRNA 5'UTR*olSfrp5*-GFP, utilizando el kit de transcripción *in vitro* de **mMESSAGE mMACHINE®** de **Ambion** con la enzima **SP6 RNA polimerasa** de **Roche**. El RNA que se generó se purificó utilizando el kit **RNeasy® Mini Kit** de **QIAGEN**, eluyéndose en 50µl de H₂O, se distribuyó en alícuotas guardándose a -20° C. También se cuantificó la concentración mediante absorbancia óptica por espectrofotometría, y se comprobó la calidad del mismo mediante electroforesis en un gel de RNA.

6.6 Hibridaciones *in situ*

6.6.1 Ribosondas de *medaka*

Una parte de las sondas habían sido generosamente cedidas con anterioridad por el Laboratorio de J. Wittbrodt, EMBL, Heidelberg, (Alemania) (*olAth5*, *ollsllet*, *olOtx2*, *olPax2*, *olPax6*, *olPrx3*, *olRd* y *olVax2*). La sonda para *olSfrp1* fue generada por el Dr. Javier López Ríos y la Dra. Pilar Esteve. El resto de sondas (*olCiclinaD1*, *olCrx*, *olMeis2.2*, *olp53*, *olp53Δ113* y *olSfrp5*) se generaron a partir de productos de RT-PCR, de forma similar a la clonación de *olSfrp5* tal y como se ha descrito con anterioridad utilizando oligonucleótidos diseñados a tal efecto (**Tabla 8**) y mediante reacciones estándar de PCR.

Tabla 8: Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR para la generación de ribosondas de *medaka*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'→3')
<i>olCiclina-D1</i> Directo1	TGGCAGAGTTCGTCTACATC
<i>olCiclina-D1</i> Directo 2	GGCGCTGAAAGTTGGTGTGT
<i>olCiclina-D1</i> Reverso 1	ACAGAAGCCAGATCCCATTTC
<i>olCiclina-D1</i> Reverso 2	GAAACTTGCGCGAAAGCTGC
<i>olCrx</i> Directo	TCTGTTCTCCAAGACCCGCTAC
<i>olCrx</i> Reverso 1	ACTCTGTCTAGAGGACCTGGAAT
<i>olCrx</i> Reverso 2	AGGCTGGACAACATCAGACGAC
<i>olMeis2.2</i> Directo 1	ATCACTCTCTAACTGGGACT
<i>olMeis2.2</i> Directo 2	ATGGCGCAAAGGTACGATGA
<i>olMeis2.2</i> Reverso	TTGGCAAAGACTGCAATGTC
<i>olp53</i> Directo 1	AGCCTCTTGGATAATAAATAGC
<i>olp53</i> Directo 2	CTTGGATAATAAATAGCGTA
<i>olp53Δ1-113</i> Directo 1	AGCCTCTTGGATAATAAATAG
<i>olp53Δ1-113</i> Directo 2	TGATGAAAAGGAGAAGGTTA
<i>olp53</i> Reverso 1	TCTTCTTGTAGACCGCAGTG
<i>olp53</i> Reverso 2	TTCTATGGGGCTGGTTTTTG

6.6.2 Generación de sondas

Para la generación de las sondas se digirió el DNA correspondientes con enzimas de restricción pertenecientes a las casas comerciales siguientes: **Amersham**, **New England Biolabs** o **Takara**, linearizándose los DNA correspondientes dejando extremos 3' protuberantes. El DNA se purificó mediante el kit de **GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit** de **Amersham Pharmacia Biotec**, y se obtuvo un DNA molde sobre el que la enzima RNA polimerasa generó una sonda de RNA de cadena sencilla en sentido contrario al mRNA endógeno. Dependiendo del vector en donde se hubieran clonado los diferentes genes, las polimerasas utilizadas serían **SP6**, **T3** o **T7 RNA Polymerase (Roche)**. La solución **DIG RNA Labeling Mix 10 x conc. (Roche)**, permite a la RNA polimerasa incorporar UTP marcado con digoxigenina (uno por cada 20-25 nucleótidos que tenga que incorporar). Las sondas se detectaron utilizando un anticuerpo capaz de reconocer la digoxigenina del UTP, que a su vez estaba acoplado a la fosfatasa alcalina (**Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments de ROCHE**). Las ribosondas generadas se purificaron mediante el **RNeasy® Mini Kit** de **QIAGEN**, se eluyeron en 40µl, se les añadió un volumen de formamida y se guardaron a -20° C. Además, la calidad de las ribosondas se comprobó mediante electroforesis de 1µl en un gel para resolver RNA.

6.6.3 Hibridación *in situ in toto* en embriones de pez *medaka*

Las hibridaciones *in situ* en embriones de pez *medaka* se hicieron según una adaptación del protocolo de hibridación *in situ* para pez cebra (Hauptmann, 1994). La modificación de este protocolo se refiere a los diferentes tiempos de digestión con proteinasa K de los embriones de pez *medaka* con respecto a los de pez cebra (**Tabla 9**).

Tabla 9: Tiempos de incubación con proteinasa K de embriones durante el procedimiento de hibridación *in situ*.

Estadio	Tiempo
1-13	1-2 min
14-16	3-4 min
17-20	5 min
21-24	7 min
25-30	10-12 min
31-32	15 min
33-34	30 min
35	45 min
36	60 min
37	75 min
38	90 min
39	115 min

Una vez realizada la detección de la sonda algunos de los embriones se montaron en bloques de gelatina/BSA y se cortaron en un vibratomo (**Leica**). Estas secciones se montaron sobre portaobjetos con PBS/Glicerol, se observaron utilizando óptica de contraste interferencial en un microscopio óptico (**Leica**) y se tomaron imágenes con una cámara digital (**Leica**).

6.7 Microinyección de embriones de medaka

Tras cruzar machos y hembras de peces fértiles (en número de 2 y 4, respectivamente) y esperar 30 minutos, se recogieron los oocitos y se mantuvieron en una disolución de *Yamamoto* (NaCl, 125mM; KCl, 30mM; CaCl₂, 15mM; pH 7.3). En una placa que contenía agarosa solidificada (1.5% en medio *Yamamoto*) se colocaron los oocitos fecundados dentro de carriles que hemos realizado con un molde de metacrilato dispuestos sobre la agarosa líquida.

El equipo de microinyección lo componían un inyector (**Eppendorf**), una lupa y un micromanipulador (**Leica**).

La solución de inyección se diluye en tampón de *Yamamoto*. Las inyecciones de morfolino se realizan en estadio de 1 o 2 células. Independientemente de aquello que se inyectara, la mezcla de inyección incluye un RNA de la GFP o dsRed a una concentración del de 100ng/μl que sirvió como control de inyección.

Para verificar la efectividad de los morfolinos se microinyectó el mRNA 5'UTR *olsfrp5*-GFP mRNA, el morfolino deseado, junto al mRNA de la dsRed como control de inyección. Estos embriones se dejaron desarrollar hasta estadio de copa óptica midiéndose la intensidad de la expresión de la GFP. La eficiencia se calculó comparando la diferencia existente de expresión entre embriones inyectados con este mRNA control, con o sin morfolino. Los valores se estandarizaron midiendo la intensidad de expresión de la dsRed que funciona como control de inyección.

6.8 Análisis de la proliferación celular

La proliferación celular se estudió realizando inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce la fosfohistona H3 (**Anti-phospho-Histone H3, Mitosis Marker, Roche**) (PH3). El protocolo que se empleó fue el suministrado por el fabricante.

Los embriones de estadios 20, 26, 30, 34 y 35 después del proceso de inmunohistoquímica se montaron en bloques de gelatina/BSA y se cortaron al vibratomo. Las secciones se montaron sobre portaobjetos con PBS/Glicerol y se observaron en campo claro en un microscopio óptico (**Leica**) cuantificándose el número de células marcadas en cada sección.

6.9 Análisis de la muerte celular

La muerte celular se estudió mediante ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling) utilizando el kit ***In Situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche)**. Secciones de embriones cortadas al criostato se permeabilizaron en acetona a -20°C durante 10 minutos, y posteriormente se siguió el protocolo suministrado por el fabricante.

Las secciones de embriones de estadios 20, 24, 30, 34 y 35 se observaron en campo claro en un microscopio óptico (**Leica**) cuantificándose el número de células marcadas en cada sección.

7. RESULTADOS

7.1 Clonación del gen *Sfrp5* en el pez *medaka*

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el gen *Sfrp1* en pollo se expresa durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central (Esteve et al., 2000). Esta expresión es similar en pez cebra (Pezeron et al., 2006; Tendeng and Houart, 2006a) y en pez *medaka* (Esteve et al., 2004), aunque durante la gastrulación en peces no se observa expresión en el mesodermo presomítico. Particularmente relevante, tanto en peces como en pollo, es la expresión en telencéfalo, copas ópticas, lente, romboencéfalo, vesículas óticas, médula espinal y somitas. Las diferencias de expresión entre especies no son peculiares de *Sfrp1* ya que en peces, la duplicación del genoma (Furutani-Seiki and Wittbrodt, 2004) ha llevado en muchos casos a una división funcional o a una subfuncionalización de los genes parálogos. Algunos ejemplos claros en el pez cebra son las duplicaciones de los genes *Pax2* (Pfeffer et al., 1998), *Pax6* (Nornes et al., 1998), *Rx* (Bailey et al., 2004) o incluso de *Sfrp1*, cuyo parálogo, *zSfrp1b* se expresa en el sincitio de la yema en la región más distal de la cola del embrión (Pezeron et al., 2006; Tendeng and Houart, 2006a), en un dominio de expresión que diverge totalmente de la de su homólogo *zSfrp1a*, indicando que posiblemente esta duplicación ha promovido una nueva función. Debido a la diferencia de expresión con sus ortólogos cabía la posibilidad de que también en pez *medaka* existiera un gen parálogo a *Sfrp1* (*olSfrp1*). Nos propusimos, por lo tanto, determinar la posible existencia de esta duplicación y analizar sus eventuales funciones.

Para ello, diseñamos varios cebadores oligonucleotídicos en zonas que presentaban una gran conservación correspondiente a las secuencias de DNA codificantes de los dominios CRD y NTR entre el pez *tetraodon*, el pez *fugu*, y el pez cebra. De esta forma, mediante distintas reacciones de PCR a partir de mRNA procedente de embriones de pez *medaka*, de estadios 19 (vesícula óptica) y 20 (copa óptica), amplificamos y clonamos toda la secuencia codificante (319 pb del exón 1, 78 pb del exón 2 y 327 del exón 3) de un gen relacionado a *Sfrp1*.

7.2 Análisis filogenético de la familia de los SFRP

La secuenciación y el análisis de los fragmentos obtenidos mostraron que el gen amplificado era diferente pero relacionado con *olSfrp1*. El análisis *in silico* realizado por comparación de secuencias aminoacídicas determinó que este gen presentaba los dominios característicos de los SFRP (**FIG. 9**): en el extremo amino terminal se encuentra el péptido señal de secreción, seguido por el dominio FZ o CRD, caracterizado por una serie de 10 cisteínas conservadas: C¹-X⁹-C²-X³⁶-C³-X⁸-C⁴-X⁶-C⁵-X⁷-C⁶-X³-C⁷-X⁶-C⁸-X¹⁶-C⁹-X⁸-10-C¹⁰ (el superíndice muestra la posición de la cisteína en la serie y X representa el número de aminoácidos que hay entre una cisteína y otra). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio netrina



(NTR), que también presenta cisteínas en posiciones conservadas: C¹-X2-C²-X13-C³-X54-C⁴-X1-C⁵-X47-C⁶).

En invertebrados también se han encontrado miembros de la familia de los *Sfrp*: tres en *Ciona intestinalis* (Dehal et al., 2002; Hino et al., 2003), y uno en *Caenorhabditis elegans*, *Strongylocentrotus purpuratus* (Illies et al., 2002) y en la esponja *Lubomirskia baicalensis* (Adell et al., 2007).

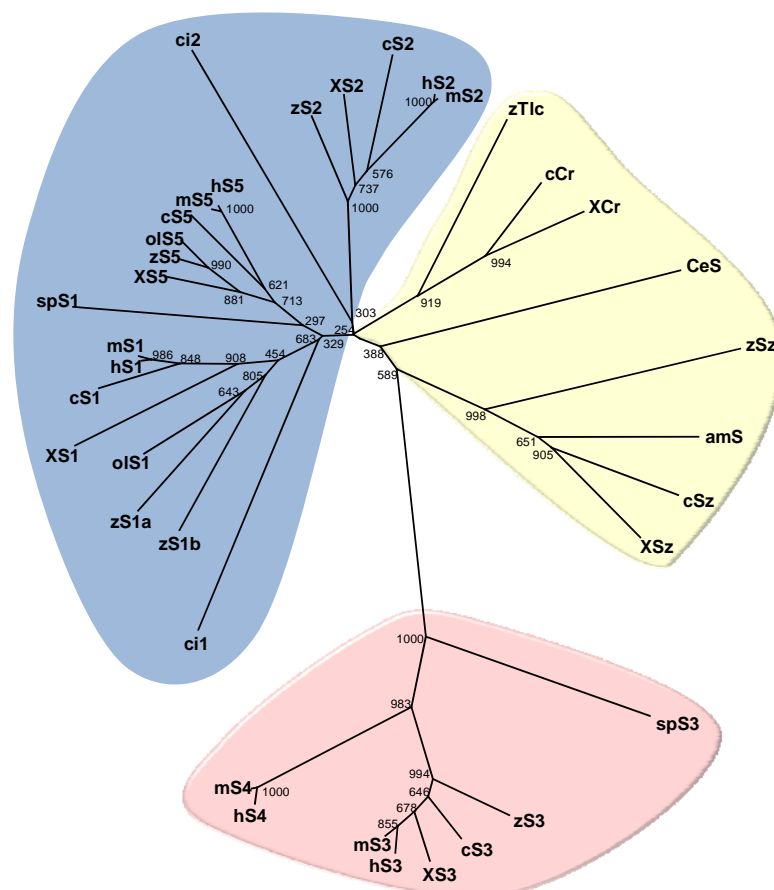


Figura 10: Árbol filogenético de la familia de los SFRPs

Análisis filogenético de la familia de los SFRPs obtenido por comparación de las secuencias aminoacídicas correspondientes al dominio CRD. La longitud de las ramas es proporcional a la divergencia de las secuencias. En los nodos de las ramas se muestra el valor del análisis de remuestreo (*bootstrapping*) para $n=1000$. La división de las subfamilias se ha remarcando en diferentes colores: en azul la de SFRP1-2-5, en rojo la de SFRP3-4, y en amarillo la de Sizzled y Crescent.

Abreviaturas: am, *Ambystoma mexicanum* (ajolote); c, *Gallus gallus* (pollo); Ce, *Caenorhabditis elegans* (nematodo); ci, *Ciona intestinalis* (ascidia); Cr, Crescent; h, *Homo sapiens* (humano); m, *Mus musculus* (ratón); ol, *Oryzias latipes* (pez medaka); S, Sfrp; sp, *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo de mar); Sz, Sizzled; X, *Xenopus laevis* (Rana de uñas africana); z, *Danio rerio* (pez cebra).

El árbol filogenético resultante de comparar las secuencias aminoacídicas del dominio CRD (Chong et al., 2002), puesto que son las secuencia más conservadas entre los miembros de la familia (**FIG. 10**), mostró la existencia de tres subfamilias: la subfamilia de los *Sfrp1*, *Sfrp2*, y *Sfrp5*, la subfamilia de los *Sfrp4* y *Sfrp3*, y la subfamilia de *Sizzled* y *Crescent*.

Este análisis también mostró que aunque el gen amplificado presentaba un 76% de identidad con la secuencia aminoacídica de *olSfrp1*, se agrupaba con las proteínas SFRP5. Consideramos, por lo tanto, que se trata del ortólogo de *Sfrp5* en el pez *medaka*, y lo denominamos *olSfrp5*.

A pesar de su divergencia evolutiva, *olSfrp5* presentaba un patrón de expresión (ver siguiente sección) coincidente con la de *olSfrp1* en el prosencefalo. Nos preguntamos, por lo tanto, si los dos genes podrían ejercer funciones similares.

7.3 Patrón de expresión de *olSfrp5*

Mediante hibridaciones *in situ* hemos caracterizado el patrón de expresión de *olSfrp5*. Para ello, hemos utilizando sondas de RNA que comprenden toda la región codificante del gen. También hemos utilizado otra ribosonda que contiene parte del 5'UTR, observando que no existía ninguna diferencia entre los patrones de expresión resultantes, validando así de forma independiente la distribución del mRNA de *olSfrp5*.

olSfrp5 comienza a expresarse en el pez *medaka* en la región prosencefálica en estadio de vesícula óptica (st19) (**FIG. 11A**). Posteriormente, a estadios 20 y 21, la expresión de *olSfrp5* se restringe a las vesículas ópticas y al telencéfalo (**FIG. 11B, C**).

Cuando se han formado las copas ópticas (st24) (**FIG. 11D**), la expresión de *olSfrp5* se restringe a la región ventral de la retina, al diencéfalo, que corresponde a la futura región hipotalámica y al mesencéfalo donde se formará el techo óptico. La expresión de *olSfrp5* en la NR coincide espacial y temporalmente con el comienzo de la neurogénesis en el ojo (Masai et al., 2000; Stenkamp, 2007) (**FIG. 11F**) y posteriormente (st30) (**FIG. 11I**) se circunscribe al disco óptico y a los márgenes ciliares, donde se mantiene incluso hasta después de la eclosión del embrión. Después de la eclosión, en el ojo se detecta expresión en el disco óptico y en la región interna de la capa nuclear interna (iINL), probablemente en una subpoblación de células amacrinas (**FIG. 11G**).

A partir de estadio 30 *olSfrp5* se expresa también en las capas superiores del techo óptico (TO), región a la cual proyectan los axones visuales y sucesivamente se extiende a todo el neuroepitelio del TO (**FIG. 11H, I, J**). Este aumento de expresión coincide espacio-temporalmente con la diferenciación de esta estructura (Nguyen et al., 1999) y la ramificación de las fibras visuales.

Otros lugares donde observamos una abundante expresión de *olSfrp5* corresponden a la región hipotalámica, las vesículas ópticas, y el tubo digestivo anterior (**FIG. 11K-M**).

Resultados previos del laboratorio demostraron que *olSfrp1* participa en el establecimiento del campo morfogénico del ojo (Esteve et al., 2004), la neurogénesis de la retina (Esteve et al., 2003) y también contribuye a la guía de los conos de crecimiento de las RGC (Rodríguez et al., 2005). El patrón de expresión de *olSfrp5* en ojo solapa en gran parte con el descrito para *olSfrp1* (Esteve et al., 2004), aunque este último se expresa más tempranamente en el campo morfogénico del ojo (Esteve et al., 2004). Nos preguntamos, por lo tanto, si *olSfrp5* podría tener unas funciones similares a las de SFRP1 durante el desarrollo del ojo.

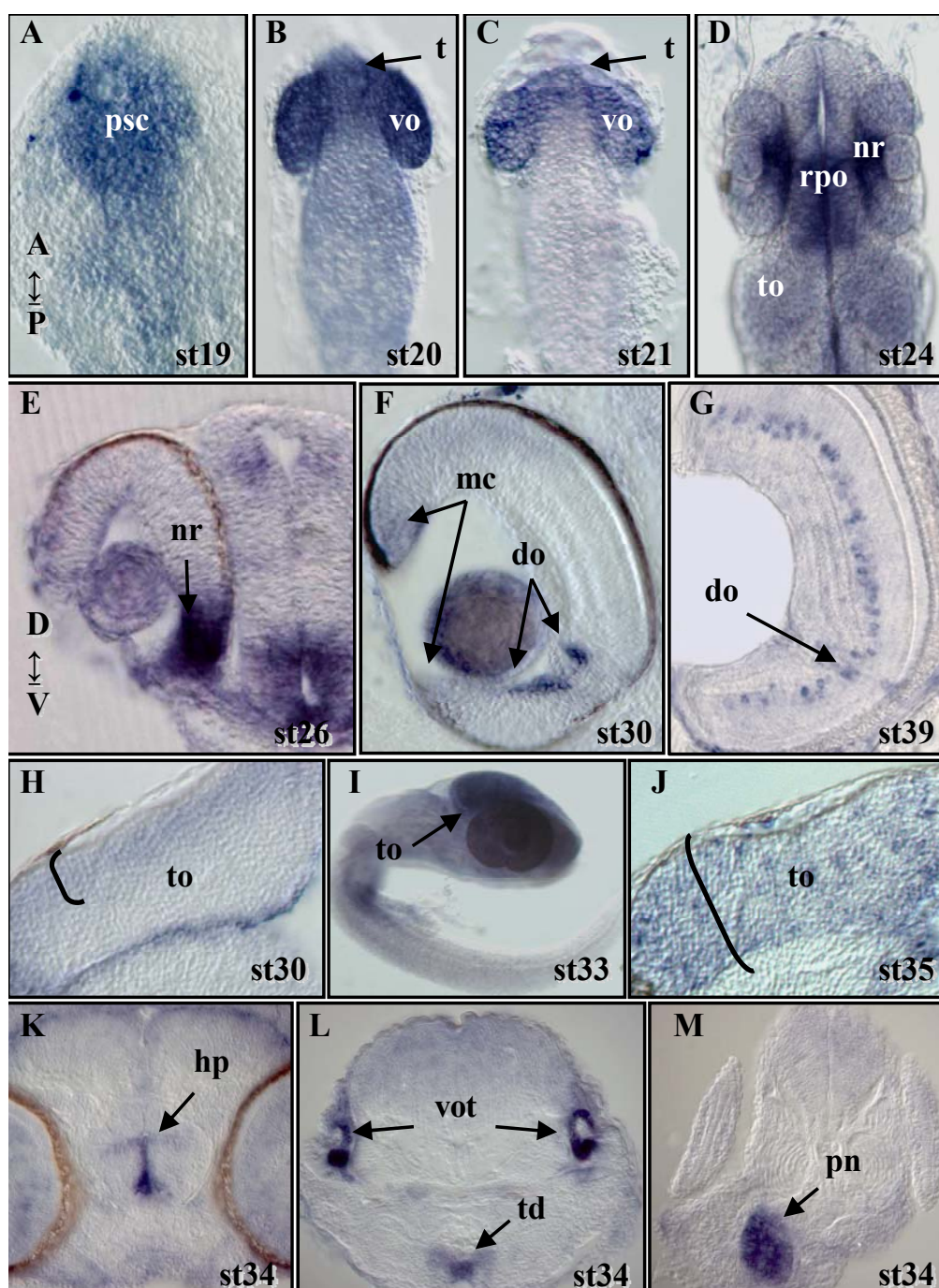


Figura 11: Patrón de expresión de *Sfrp5* en el pez *medaka* durante el desarrollo embrionario.

Embriones de *medaka* hibridados *in toto* con la ribosonda correspondiente a toda la secuencia codificante de *olSfrp5* (visiones dorsales en A, B, C, D; secciones frontales de vibratomo de embriones en E, F, G, H, J, K, L, M; visión lateral en I). La expresión de *olSfrp5* comienza después de la gastrulación (st19) en la región prosencefálica (A). Posteriormente se expresa en las vesículas ópticas y en el telencéfalo (st20-21) (B, C). A st24, los transcritos se localizan en las copas ópticas, la región hipotalámica y el techo óptico (D). En el hipotálamo la expresión se mantiene con posterioridad en estadio 26 (E) y st34 (K). Durante la neurogénesis (st26-35) la expresión se restringe desde la región ventral de la retina (E) al disco óptico y a los márgenes ciliares (F). En st39 la expresión en el ojo se limita al disco óptico y a una subpoblación de células en la iINL. En el TO la expresión se expande desde la región dorsal (st30) (H) hasta la más ventral (st35) (I, J). También expresan *olSfrp5* las vesículas óticas, el tubo digestivo (L) y el páncreas (M).

Abreviaturas: A, anterior; co, copa óptica; D, dorsal; do, disco óptico; dpf, días post-fertilización; hp, hipotálamo; iINL, inner part of the inner nuclear layer (región interna de la capa nuclear interna); mc, margen ciliar; nr, neuroretina; P, posterior; pn, páncreas; pna, placa neural anterior; rpo, región preóptica; st, estadio; t, telencéfalo; td, tubo digestivo; to, techo óptico; V, ventral; vo, vesícula óptica; vot, vesícula ótica.

7.4 Determinación de la eficacia de los distintos morfolinós

Para abordar esta cuestión utilizamos una estrategia basada en la pérdida de función mediante la inyección de morfolinós en estadio de 2 células. Los morfolinós son oligonucleótidos en antisentido modificados químicamente que bloquean la traducción del mRNA de un gen y, por consiguiente, permiten estudiar los efectos de la disminución de los niveles de una proteína (Ekker, 2000; Nasevicius and Ekker, 2000). Basándonos en las secuencias de *olSfrp5* diseñamos dos morfolinós en la región 5' UTR a 9 y 18 pb antes del codón ATG que codifica para el inicio de traducción del gen (**FIG. 12**). Comprobamos la eficiencia de los morfolino inyectando ambos por separado y a diferentes concentraciones junto a un mRNA resultante de la fusión de la secuencia 5' UTR, los primeros doce aminoácidos de *olSfrp5* y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (eGFP) (**FIG. 13A**). MoA reducía la expresión de la eGFP en los embriones un 66,51% cuando se inyectaba a 0,12mM y un 88,77% cuando se inyectaba a 0,6mM (**FIG. 13B**). El MoB reducía la expresión de la eGFP en los embriones un 65% cuando se inyectaba a 0,03mM y un 93,7% cuando se inyectaba a 0,3mM (**FIG. 13B**). Por lo tanto el MoB era más eficiente que el MoA, y fue el utilizado para realizar los estudios funcionales.

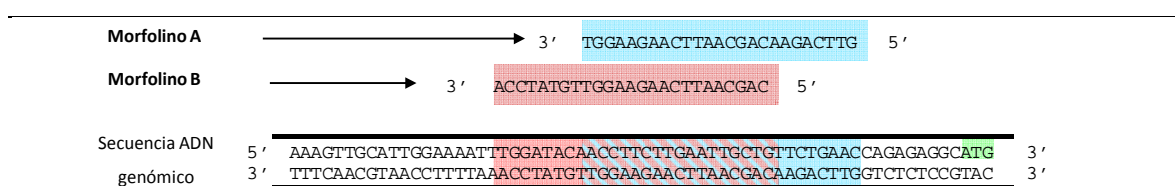


Figura 12: Secuencias de los morfolinós en relación a la secuencia del gen *olSfrp5* del pez *medaka*

Morfolinós diseñados sobre la secuencia genómica del gen *olSfrp5*. El morfolino A (MoA), en color azul, se encuentra a 9 pares de bases antes del triplete que codifica para la metionina iniciadora del gen, señalada en color verde. El morfolino B (MoB), en color rojo, fue diseñado a 18 pares de bases antes del triplete codificante de la metionina iniciadora.

Para comprobar posibles efectos inespecíficos del MoB (Eisen and Smith, 2008), diseñamos un morfolino con la misma secuencia que el MoB exceptuando cinco bases (MoMissB). La microinyección de MoMissB en oocitos de pez *medaka* no reducía la expresión del gen reportero (**FIG. 13B**), ni provocaba ninguna alteración fenotípica en los embriones.

Se ha demostrado que la utilización de determinados morfolinós induce de forma inespecífica la expresión de *olp53*, una proteína implicada en apoptosis (Robu et al., 2007), en particular una forma truncada, denominada *olp53Δ1-113*, parece ser predictiva de este efecto inespecífico. Comprobamos, por lo tanto, que nuestro morfolino no producía efectos inespecíficos determinando los niveles de expresión de la forma truncada de *olp53*. Las hibridaciones *in situ* sobre

embriones de pez *medaka* inyectados con MoB en estadio de vesícula óptica (st19-20) no mostraron alteración ninguna de la expresión de esta forma truncada (datos no mostrados).

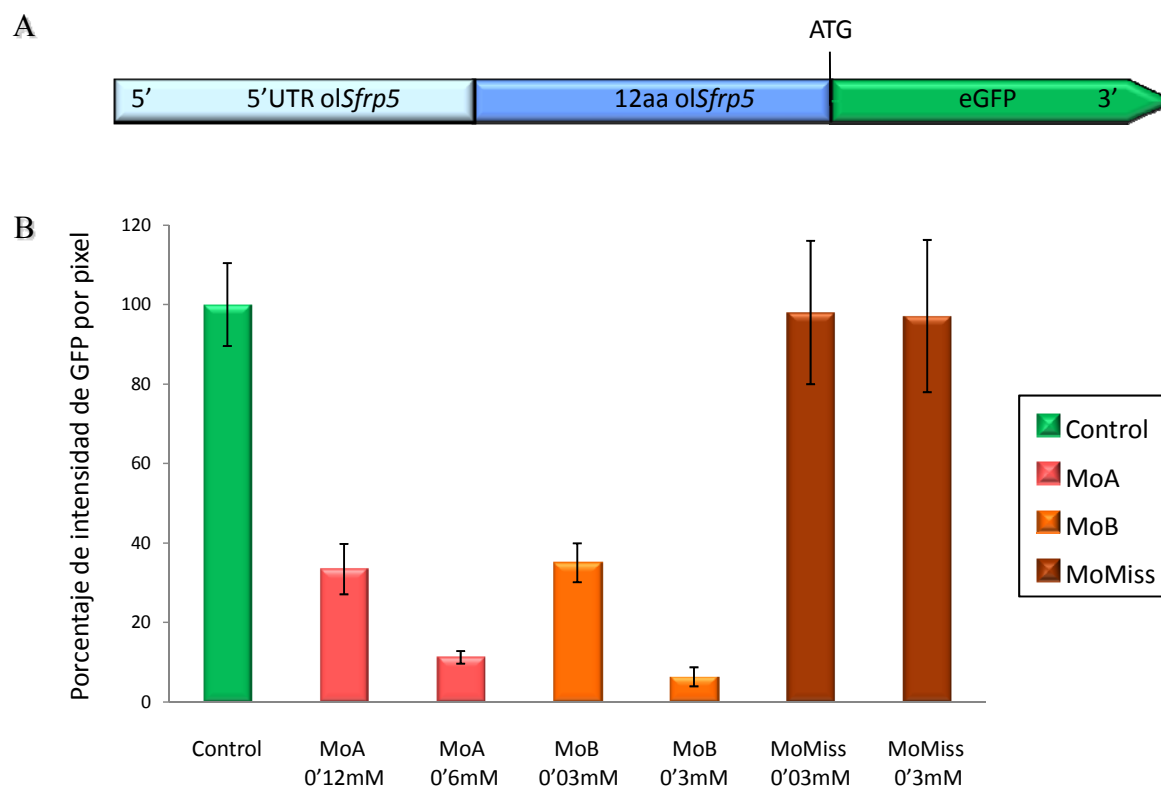


Figura 13: Los morfolinios contra *oISfrp5* interfieren con su traducción.

(A) Representación esquemática del constructo usado para testar la eficiencia de los morfolinios MoA y MoB para interferir con la traducción de *oISfrp5*. El constructo contenía la región 5' no traducida del gen *oISfrp5* junto a los 12 primeros aminoácidos, y fusionado en el mismo marco de lectura la secuencia codificante de la eGFP.

(B) Gráfica que representa el porcentaje de la expresión de la eGFP en embriones de *medaka* inyectados en estadio de 2 células. Cada columna representa la media de dos inyecciones sobre, al menos, 50 embriones de *medaka*. La expresión de la eGFP se cuantifica a las 24 hpf. en la región de la cabeza del embrión mediante el programa ImageJ. La columna de color verde representa la expresión de la eGFP en embriones inyectados con la construcción control normalizada al 100%. El resto de columnas representan la expresión de la eGFP en embriones en los se inyecta el ARNm control y los morfolinios a diferentes concentraciones. Nótese que el morfolino A (columnas de color rojo) es menos eficiente que el morfolino B (columnas de color naranja), puesto que para obtener porcentajes de expresión similares se requiere de una menor concentración de morfolino microinyectado. El morfolino que tiene 5 bases desapareadas (MoMiss) no reduce la expresión de la eGFP (columnas de color marrón). El test estadístico utilizado fue el de Student (***) $P < 0,001$.

7.5 Fenotipos inducidos por la pérdida de función de *olSfrp5*

Morfológicamente la microinyección de MoB en oocitos fecundados de pez *medaka* provocaba una reducción del tamaño de los ojos y del mesencéfalo (**FIG. 14**). Sin embargo, el fenotipo era variable y en algunos casos los embriones no llegaban a terminar su desarrollo. Para cuantificar estos efectos calculamos el porcentaje de embriones normales, con alteraciones fenotípicas visibles o muertos. Para un número total de 126 embriones repartidos en dos inyecciones el 38% de los embriones inyectados con MoB presentaban un fenotipo claramente visible mientras que el 67% aparentaban tener una morfología normal; solamente el 5% de los embriones morían al ser inyectados con el morfolino (**Tabla 10**).

Tabla 10. Porcentajes de fenotipos provocado por el MoB.

MoMissMoB (0.3m; n=98)	<i>Embriones sin fenotipo</i>	100%
MoB (0.3mM; n=126)	<i>Embriones sin fenotipo</i>	66.9%
	<i>Embriones con fenotipo microftálmico</i>	37.9%
	<i>Embriones muertos</i>	5.2%

Tabla 10: Porcentaje del fenotipo observado en embriones de *medaka* inyectados con el MoB a 0.3mM transcurridas 24 horas.

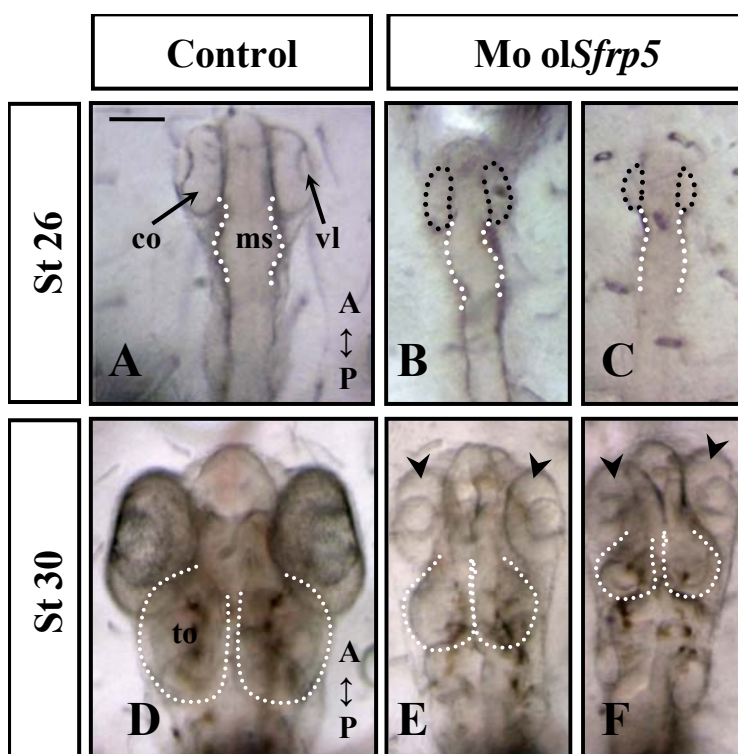


Figura 14: La microinyección del MoB provoca alteraciones morfológicas visibles durante el desarrollo embrionario.

(A-F) Visión dorsal en campo claro de embriones de *medaka in vivo* controles (A, D) e inyectados con el MoB (B, C, E, F), en estadio 20 (A-C), y 30 (D-F). Los embriones tratados con el morfolino de *olSfrp5* presentan un retraso en el desarrollo de los ojos (línea de puntos negra) (B, C) y de la región mesencefálica (línea de puntos blanca) (E, F). Las barra de escala representa 0,1mm.

Abreviaturas: A, anterior; co, copa óptica; est, estadio; ms, mesencéfalo; P, posterior; to, techo óptico; vl, vesícula de la lente.

7.6 La reducción de los niveles de *olSfrp5* provoca microftalmia

El fenotipo más evidente que presentan los embriones microinyectados con el MoB de *olSfrp5* es una disminución del tamaño de los ojos o microftalmia mantenida a lo largo del desarrollo ocular, que puede ser cuantificada midiendo el área de los ojos en diferentes estadios. El tamaño de los ojos de los embriones morfantes se reduce en torno al 60% comparándola con los embriones controles (**FIG. 15**).

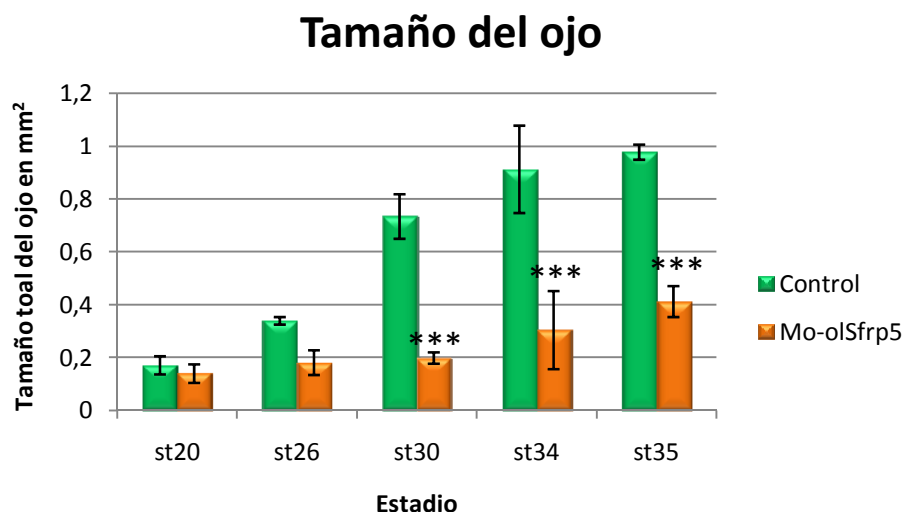


Figura 15: Los embriones morfantes de *Sfrp5* muestran un tamaño de ojo menor que los embriones controles.

La gráfica muestra la comparación del tamaño del ojo entre embriones controles y embriones morfantes para *olSfrp5*, en los estadios 20, 26, 30, 34 y 35. Cada columna representa el porcentaje del tamaño medio de un ojo (se cuantifican al menos 10 ojos por condición y estadio). El valor del tamaño de un ojo se calculó sumando el área de todas las secciones de un ojo cortadas al vibratomo con un grosor de 15 μm cada una de ellas. Se observa que los ojos de los embriones morfantes son un 40% más pequeños que los embriones controles. El test estadístico utilizado fue el de Student (***) $P < 0,001$.

7.7 *olSFRP5* controla la proliferación celular durante el desarrollo de las copas ópticas

Puesto que la inyección de MoB causaba alteraciones evidentes a partir de estadio de vesícula óptica, analizamos la expresión de varios genes implicados en el establecimiento del campo morfogénico del ojo (*Rx3*, *Six3*, *Otx2*) y de genes implicados en la formación del eje anteroposterior (*Hnf3 β* , *Goosecoid*, *Brachury*) observándose que en etapas tempranas los embriones no sufrían alteraciones, de acuerdo con la ausencia de expresión de *olSfrp5* en estos estadios (datos no mostrados).

Puesto que las vesículas ópticas eran más pequeñas nos preguntamos si existía alguna alteración en la proliferación celular. El análisis inmunohistoquímico de fosfo-HistonaH3 (PH3) (**FIG. 18**) reveló que el número de células en fase M variaba en embriones inyectados con el MoB con fenotipo microftálmico con respecto a los embriones controles.

Durante la formación de las vesículas ópticas (st20) se observa una ligera disminución de la proliferación celular entre los embriones controles y los embriones inyectados con el MoB (**FIG. 18A**). Cuando las copas ópticas se han formado a estadio 26 los embriones tratados con el MoB muestran una tasa de proliferación celular ligeramente reducida respecto a los embriones controles (**FIG. 18B, F**).

Más tarde, en los estadios 30 a 35, la NR se encuentra totalmente laminada y se han diferenciado los principales tipos de neuronas, y la proliferación celular se restringe a la región de los márgenes ciliares (MC) (**FIG. 18A, C, D**). En los embriones morfantes la NR no se encuentra bien laminada y la proliferación se mantiene por toda la NR, fundamentalmente en la región basal aunque también se observan células en parte de la región interna de la NR (**FIG. 18A, G, H**).

Coincidente con el aumento de la proliferación celular en los embriones morfantes de *SFRP5*, el nivel de expresión de *olCycD1*, un marcador de progresión en el ciclo celular, parecía aumentado en la región del margen ciliar (14/29, 48%), con respecto a los embriones controles (**FIG. 18E, I**).

Estos datos muestran que de forma neta la proliferación aumenta durante el desarrollo de la NR en los embriones inyectados con MoB, lo cual no explica el fenotipo microftálmico.

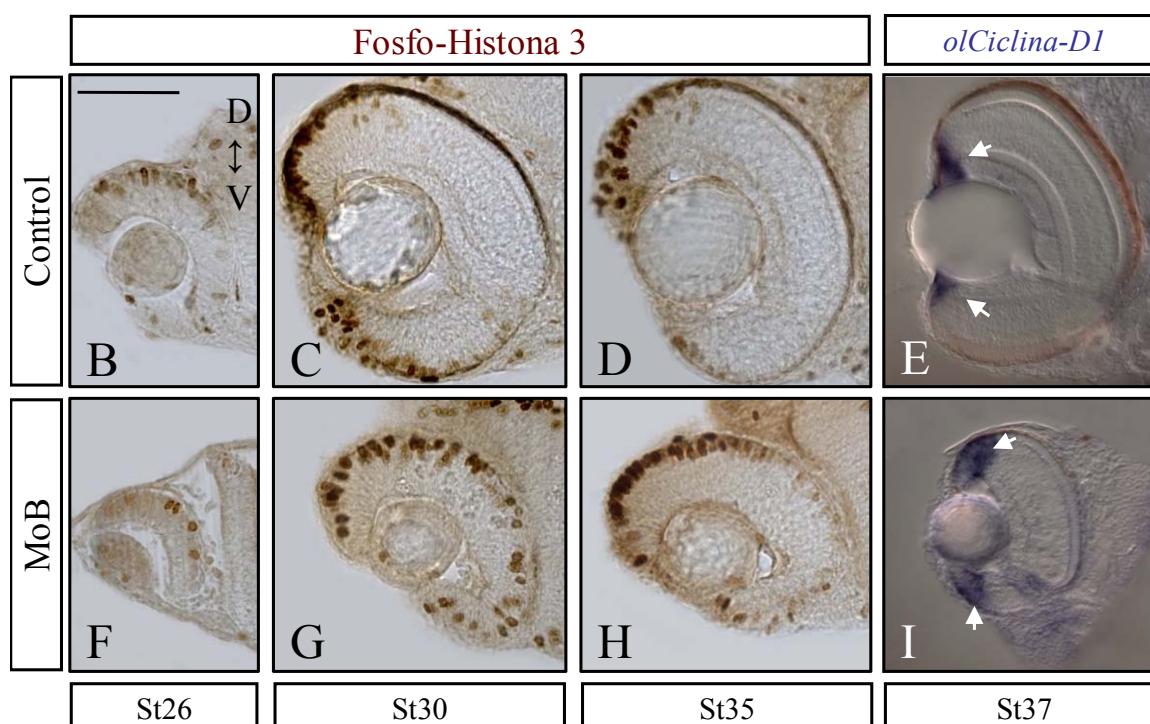
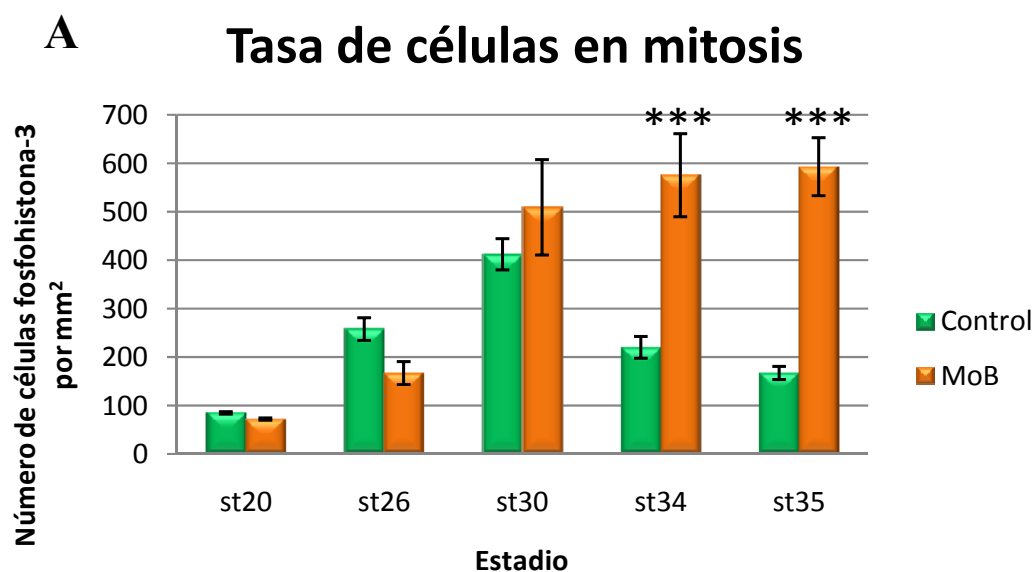


Figura 18: La disminución de la expresión de *olSfrp5* causa variaciones en la tasa de proliferación celular durante el desarrollo de los ojos.

La gráfica en (A) muestra la comparación del número de células PH3 positivas entre el tamaño de cada retina en embriones controles (columnas verdes) y embriones morfantes para *olSfrp5* (columnas naranjas), en los estadios 20, 26, 30, 34 y 35. Se cuantifican al menos 10 ojos por condición y estadio. El valor del tamaño de un ojo se calculó sumando el área de todas las secciones de un ojo cortadas con un vibratomo con un grosor de 15 μ m. Se observa que los ojos de los embriones morfantes son un 40% más pequeños que los embriones controles. El test estadístico utilizado fue el de Student (***) $P < 0,001$. La barra de error representa 0,1mm.

B-I. Secciones frontales de vibratomo de ojos de embriones de pez *medaka* controles (B-E) y morfantes de *olSfrp5* (F-I), en los que se ha realizado una inmunohistoquímica para PH3 (A-C, E-H) o hibridados con la ribosonda de *olCyclinD1* (D, I) estadios 26 (B, F), 30 (C, G), 35 (D, H) y 37 (E, I). Nótese como mientras en estadio 26 la proliferación se encuentra reducida en los embriones tratados con el MoB, a estadios 30 y 35 la proliferación es mayor, con algunas células positivas en posición ectópica (flechas)

7.8 Los morfantes de *olSfrp5* aumentan los niveles de apoptosis durante el desarrollo ocular

Para tratar de explicar el fenotipo microftálmico de los embriones tratados con MoB nos propusimos investigar si existían alteraciones en la tasa apoptótica en la retina. Para ello, analizamos la apoptosis mediante ensayos de TUNEL tanto en embriones controles como en embriones microinyectados con MoB.

El análisis reveló que en los embriones morfantes existe un aumento del número de células en apoptosis, tanto en número total (exceptuando a st24), como referido al tamaño de la retina, durante todo el desarrollo ocular (FIG. 19).

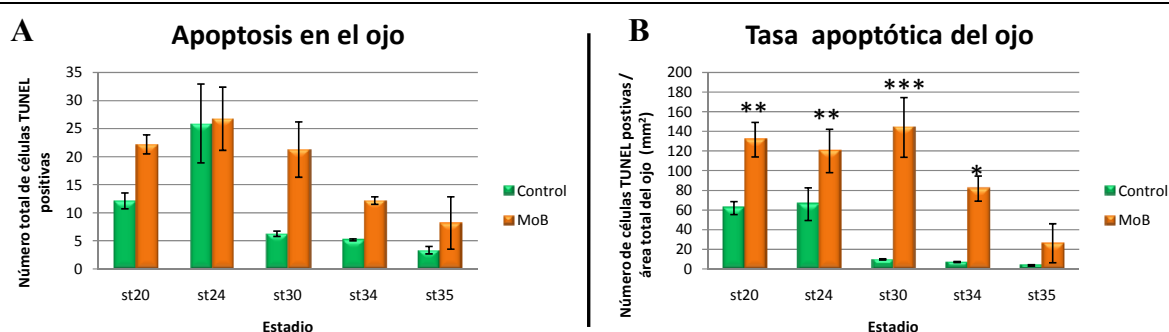


Figura 19: Los morfantes de *olSFRP5* muestran un aumento de la apoptosis durante el desarrollo de los ojos.

La gráfica en (A) muestra la comparación del número de células TUNEL positivas entre embriones controles (columnas de color verde) y embriones morfantes para *olSfrp5* (columnas de color naranja), en los estadios 20, 24, 30, 34 y 35. Se cuantifican los dos ojos de al menos 3 embriones de cada estadio.

La gráfica en (B) muestra la comparación de la tasa apoptótica entre los embriones controles (columnas verde) y los embriones tratados con el MoB (columnas naranja). La tasa apoptótica se calcula como el número de células TUNEL positivas entre el tamaño total del ojo, en milímetros cuadrados. Se cuantifican los dos ojos de al menos 3 embriones de cada estadio.

El test estadístico utilizado fue el de comparaciones múltiples de Student (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

Para comprobar que el aumento de la tasa apoptótica no es un efecto inespecífico del MoB realizamos un experimento de rescate del fenotipo del morfolino (FIG.20). Para ello, realizamos ensayos de TUNEL en embriones inyectados en diferentes condiciones:

1. mRNA de eGFP (25ng/μl), controles, también se inyecta en el resto de condiciones.
2. MoB (0,3mM).
3. MoMissMoB (0,3mM), para descartar un efecto inespecífico de la inyección del morfolino sobre los embriones.
4. mRNA de *olSfrp5*, 12,5ng/μl.
5. MoB y mRNA-*olSfrp5*,

La microinyección de mRNA-*olSfrp5* se realizó a concentraciones muy bajas (12,5 ng/μl), puesto que la sobreexpresión a concentraciones mayores producía una fenocopia de la inyección del mRNA de *olSfrp1*, con una expansión muy grande del territorio de ojo y un acortamiento drástico del eje antero-posterior (Esteve et al., 2004). Los embriones se recogieron a estadio 19-20, cuando *olSfrp5* comienza a expresarse. En ninguna de las condiciones hay diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los ojos de los embriones (**FIG. 20A**).

El análisis de la tasa de muerte celular indica que la inyección de mRNA-*olSfrp5* disminuye la tasa de apoptosis frente a los controles, observándose un fenotipo contrario al que se observa con el tratamiento del morfolino. La coinyección de MoB y mRNA-*olSfrp5* rescata el fenotipo, y los valores de tasa apoptótica se asemejan a los valores que muestran los embriones controles (**FIG. 20B**).

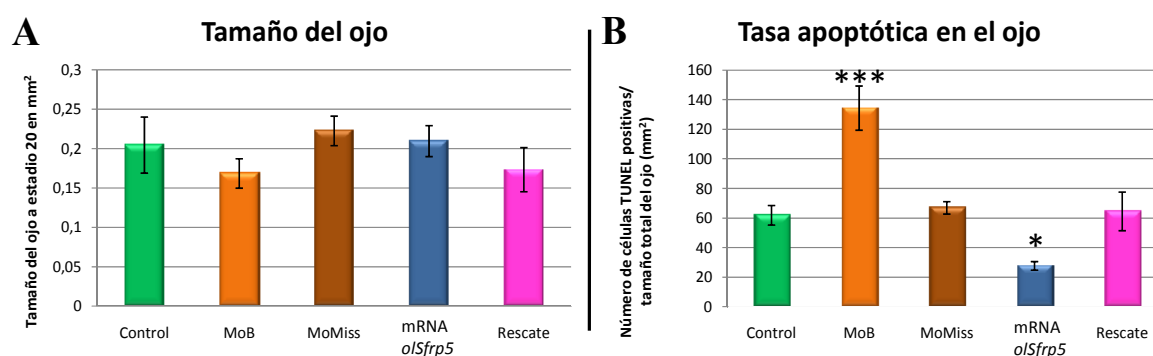


Figura 20: La inyección del mRNA de *olSfrp5* rescata el aumento de apoptosis en los embriones tratados con el MoB.

A. Gráfica que muestra el tamaño de los ojos de embriones controles (en color verde), inyectados con el MoB (naranja), con el MoMiss (marrón), con mRNA-*olSfrp5* (azul) o co-inyectados con mRNA-*olSfrp5* y MoB (rosa). Se analizaron al menos 5 embriones de cada condición. El valor del tamaño de un ojo se calculó sumando el área de todas las secciones de un ojo cortadas con un vibratomo con un grosor de 15 μm. El tamaño de los ojos de los embriones es similar en las diferentes condiciones de la inyección.

B. Gráfica que muestra la variación de la tasa apoptótica en los embriones inyectados con el MoB (naranja, con el MoMiss (marrón), con mRNA-*olSfrp5* (azul) o co-inyectados con mRNA-*olSfrp5* y MoB (rosa). La tasa apoptótica se calcula como el número de células TUNEL positivas entre el tamaño total del ojo, en milímetros cuadrados. Se cuantifican los dos ojos de al menos 5 embriones de cada estadio. Se observa que la inyección de MoB aumenta la tasa de apoptosis en la retina, mientras que la sobreexpresión de *olSfrp5* la disminuye. La inyección conjunta de MoB y el mRNA-*olSfrp5* produce en la retina unos niveles de apoptosis similares a la de los embriones controles.

El test estadístico utilizado fue el de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer (***) $P < 0.001$; (*) $P < 0.05$.

7.9 La disminución de la expresión de *olSfrp5* causa defectos en la regionalización de la copa óptica y ocasionalmente colobomas oculares

Para caracterizar si la regionalización de la copa óptica se encontraba modificada en los embriones morfantes de SFRP5, estudiamos los patrones de expresión de genes necesarios para la especificación del primordio ocular. Entre ellos se encuentran los factores de transcripción del tipo *homeobox* como *Pax6*, *Pax2* y *Vax2*. Como se describió en la Introducción de esta Tesis, estos genes son esenciales para la regionalización y la morfogénesis del ojo: *Pax6* es necesario para la formación de las copas ópticas, y *Pax2* y *Vax2* para la especificación del tallo óptico.

En los embriones morfantes, la expresión de *olPax2* se modifica durante la formación de las copas ópticas. A st20 se expresa en la región dorsal de la retina prospectiva en vesícula óptica, aunque su función en esta región no es conocida, y los embriones morfantes mostraban un aumento de expresión en esta región (13/25, 52%) (**FIG. 21A, A', D, D'**). Por su parte, *olVax2* se expresa en la región ventral de la copa óptica, y en los embriones inyectados con MoB disminuía la presencia de transcritos en esta región (29/37, 78%) (**FIG. 21B, E**).

En estadios más tardíos la expresión de *olPax2* o *olVax2*, en el tallo óptico se mantenía disminuida (*olVax2*: 25/33, 75%; *olPax2*: 25/42, 60%), aunque se evidenciaba un aumento de la expresión de *olPax2* en la retina dorsal en el ojo (**FIG. 22**).

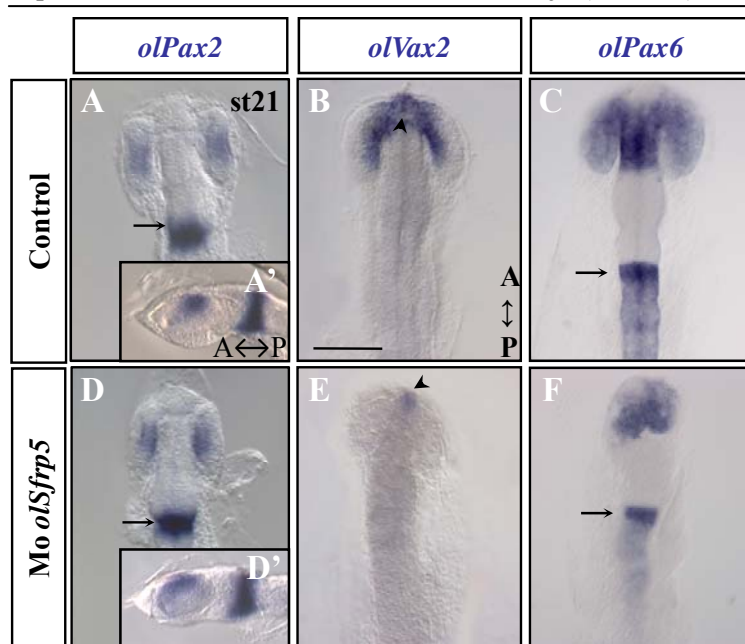


Figura 21: La microinyección del MoB en pez *medaka* altera la expresión de genes marcadores de ojo

Visión dorsal (A-F) y lateral (A', D') de embriones de *medaka* a st21, donde se comparan los embriones controles (A-C) con los inyectados con el MoB (D-F). Los embriones se han hibridado *in toto* con sondas para los factores de transcripción *olPax2* (A, D), *olVax2* (B, E) y *olPax6* (C, F). Comparando con los embriones controles, en los morfantes de *olSFRP5* la expresión de *olPax2* en la retina dorsal aumenta, mientras que en la retina ventral disminuye la expresión de *olVax2*. *olPax6* se expresa en las copas ópticas (C), y en los embriones morfantes se reduce el dominio de expresión (F). La expresión de estos genes en lugares donde no se expresa *olSfrp5*, como en el istmo (flechas en A, D, C, F) o el telencéfalo (puntas de flecha en B y E) no varía en los embriones morfantes. La barra de escala representa 0,1mm.

Abreviaturas: A, anterior; hpf, horas post-fertilización; P, posterior; st, estadio.

El gen *olPax6* se expresa en la vesícula óptica y en el istmo, y en los embriones inyectados con el MoB su dominio de expresión se encuentra reducido, (13/26, 50%) (**FIG. 21C, F**).

Estas alteraciones de expresión son específicas del territorio de ojo ya que la expresión de estos genes en los embriones morfantes en lugares donde no se expresa *olSfrp5* se mantiene inalterada: en el istmo para *olPax2* y *olPax6* (**FIG. 21A, C, D, F**: flechas), o en el telencéfalo para *olVax2* (**FIG. 21B, E**: puntas de flecha).

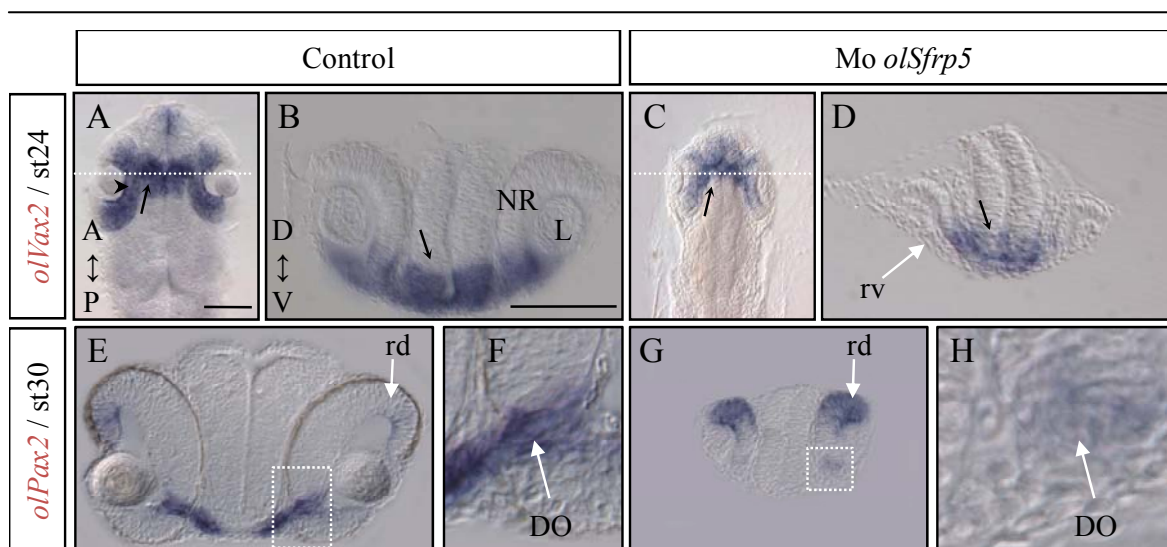


Figura 22: *olSfrp5* altera la especificación de la fisura óptica.

Visiones dorsales (**A, C**) y secciones frontales de vibratomo (**B, D, E-H**) correspondientes a embriones de *medaka* controles (**A, B, E, F**) e inyectados con el MoB (**C, D, G, H**), en los que se ha realizado hibridaciones *in situ in toto* de los factores de transcripción *olVax2* en estadio 24 (**A-D**) y *olPax2* en estadio 30 (**E-H**). Obsérvese cómo en los embriones tratados con el MoB se reduce la expresión de la región ventral de la retina (**C, D**) y del disco óptico (**G, H**). Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: A, anterior; D, dorsal; do, disco óptico; L, lente; NR, neurorretina; P, posterior; rv, retina ventral; st, estadio; V, ventral.

Puesto que *olSfrp1* se expresa en la copa óptica de forma similar a *olSfrp5*, analizamos si su expresión se veía alterada en los morfantes de *olSfrp5*. En embriones inyectados con el MoB, *olSfrp1* deja de expresarse significativamente en la NR y en las vesículas óticas (21/39, 54%) (**FIG. 23B, D**), mientras que su expresión en los somitas, lugar donde no se expresa *olSfrp5*, se mantiene intacta (**FIG. 23 B**).

En embriones de pez *medaka* en los que hemos inyectado el MoB de *olSfrp5*, además del fenotipo microftálmico (38%), aparecen colobomas oculares (~10%). Los colobomas oculares (Onwochei et al., 2000) son malformaciones congénitas que se caracterizan por la presencia de cortes, fisuras o muescas en el ojo. En algunos casos se asocian a otras alteraciones fenotípicas, como la microftalmia (Porges et al., 1992). Este defecto era fácilmente identificables en peces transgénicos *olAth5::eGFP* en estadios tardíos previos a la eclosión (**FIG. 24A-F**), ya que en estos

embriones la expresión de la GFP en los axones de las RGC evidencian la desfasciculación de los axones asociada a la presencia de un coloboma en la región ventral de la retina.

Puesto que *olSfrp1* también se expresa en la región de la fisura óptica, y su expresión disminuía en embriones inyectados con el MoB (FIG. 23), nos preguntamos si suprimiendo la función de olSFRP1 causaríamos este mismo fenotipo. Cuando microinyectamos el morfolino de *olSfrp1* encontrábamos fenotipos con colobomas con una frecuencia, similar a la observada en los morfantes de *olSfrp5* (~10%) (datos no mostrados).

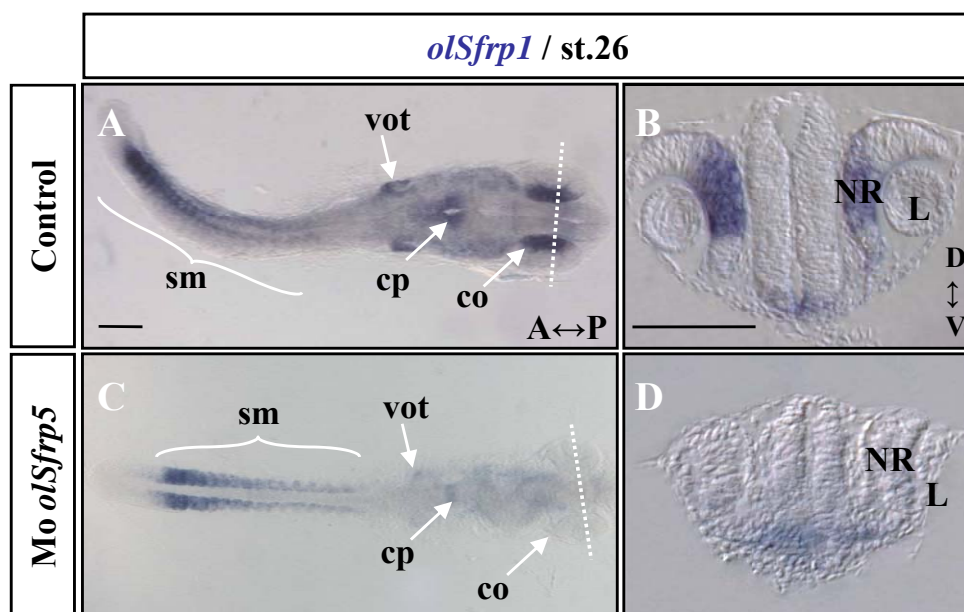


Figura 23: La carencia de olSFRP5 afecta la expresión de *olSfrp1*.

Hibridaciones *in situ* del gen *olSfrp1* en embriones de *medaka* a estadio 26 (A-D), comparando embriones controles (A, B), frente a embriones inyectados con el MoB (C, D). En (A) se muestra la visión dorsal de un embrión de *medaka* control en el que *olSfrp1* se expresa la NR, vesículas óticas, la región situada entre el cerebro medio y posterior, y los somitas. En una sección al nivel señalado por la línea punteada blanca (B), se observa la expresión del gen *olSfrp1* en la NR y la región preóptica. En (C) se muestra una visión dorsal de un embrión microinyectado con el MoB. La expresión de *olSfrp1* en los somitas no varía. En los ojos y las copas ópticas, la expresión de *olSfrp1* se encuentra reducida. En (D) se muestra una sección realizada al nivel indicado por la línea blanca punteada en donde no aparecen transcritos de *olSfrp1* en los ojos aunque sí en la región preóptica. Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: A, anterior; co, copa óptica; cp, cerebro posterior; D, dorsal; L, lente; NR, neuroretina; P, posterior; sm, somitas; est, estadio; V, ventral; vot, vesículas óticas.

La inactivación génica de *olPax2* o *olVax2*, que se expresan en el tallo óptico (FIG. 22A-D) causa coloboma (Barbieri et al., 2002; Sanyanusin et al., 1995; Take-uchi et al., 2003; Weston et al., 2003). En embriones microinyectados con el MoB la expresión de estos genes disminuía (*olVax2*: 25/33, 75%; *olPax2*: 25/42, 60%), sugiriendo que la función de *olSfrp5* en el tallo óptico podría ser facilitar la expresión de estos genes (FIG. 25E-H).

La expresión inicial de *Pax2* y *Vax2* es dependiente de la señalización mediada por SHH. En los morfantes de *olSFPR5* los niveles de expresión de *olShh* no varía (datos no mostrados, 0/39, 0%), sugiriendo que *olSfrp1* y *olSfrp5* podrían actuar de forma independiente de *olShh* sobre los niveles de expresión de *olPax2* y *olVax2*.

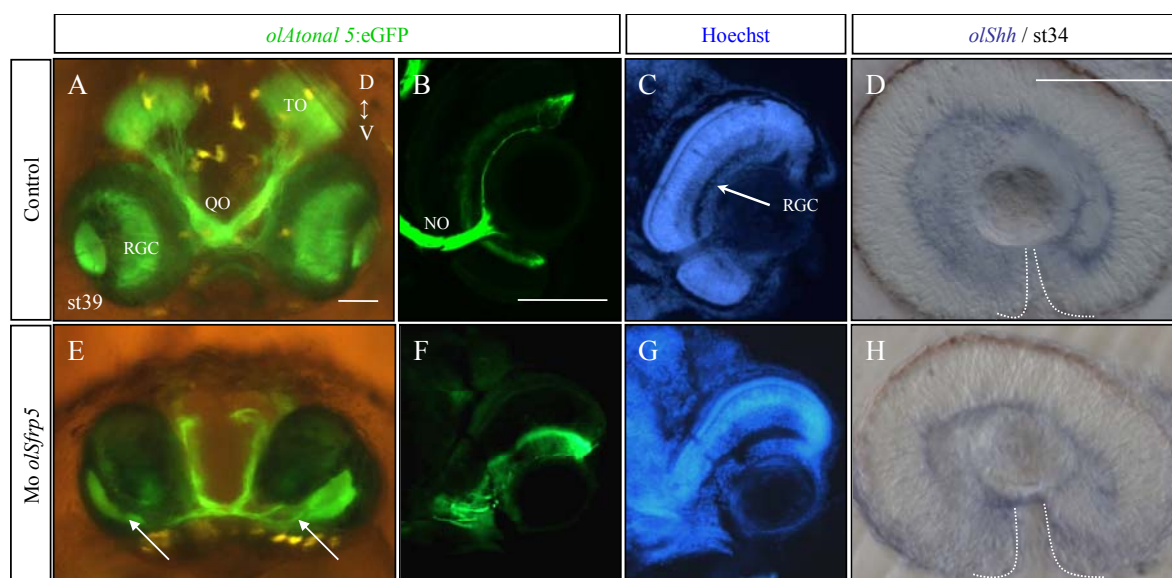


Figura 24: La microinyección del morfolino de *olSfrp5* provoca colobomas oculares en los embriones de *medaka*.

Visión frontal por fluorescencia de embriones de pez *medaka* transgénicos *olAth5::eGFP*, en (A) un embrión control y en (D) un embrión morfante de *olSfrp5* con coloboma (flechas de color blanco). (B, C) corresponden a secciones frontales de criostato de los embriones control y (E, F) de los morfante observándose la expresión de la eGFP de los axones de las RGC (A, B, D, E) y los núcleos celulares mediante tinción con Hoechst (C, F). En (G-I) se muestran secciones laterales de vibratomo de embriones de *medaka* hibridados con la ribosonda de *olShh* (6/12, 50%) en un embrión control (G), un embrión con coloboma inyectado con el MoB (H), en donde se observa una disminución en la región de las RGC. La región correspondiente a la fisura óptica se ha marcado con una línea de puntos blanca. Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: D, dorsal; QO, quiasma óptico; NO, nervio, óptico; RGC, *retinal ganglion cells*; st, estadio; TO, techo óptico; V, ventral.

7.10 *olSfrp5* es necesario en la diferenciación de la neurorretina

Tras la formación de la copa óptica, las células de la NR aumentan su ritmo mitótico generándose progenitores neurales que salen de ciclo y se diferencian. La expresión de *olSfrp5* coincide espacial y temporalmente con el comienzo de la neurogénesis sugiriendo que *olSfrp5* podría tener un papel clave en este proceso.

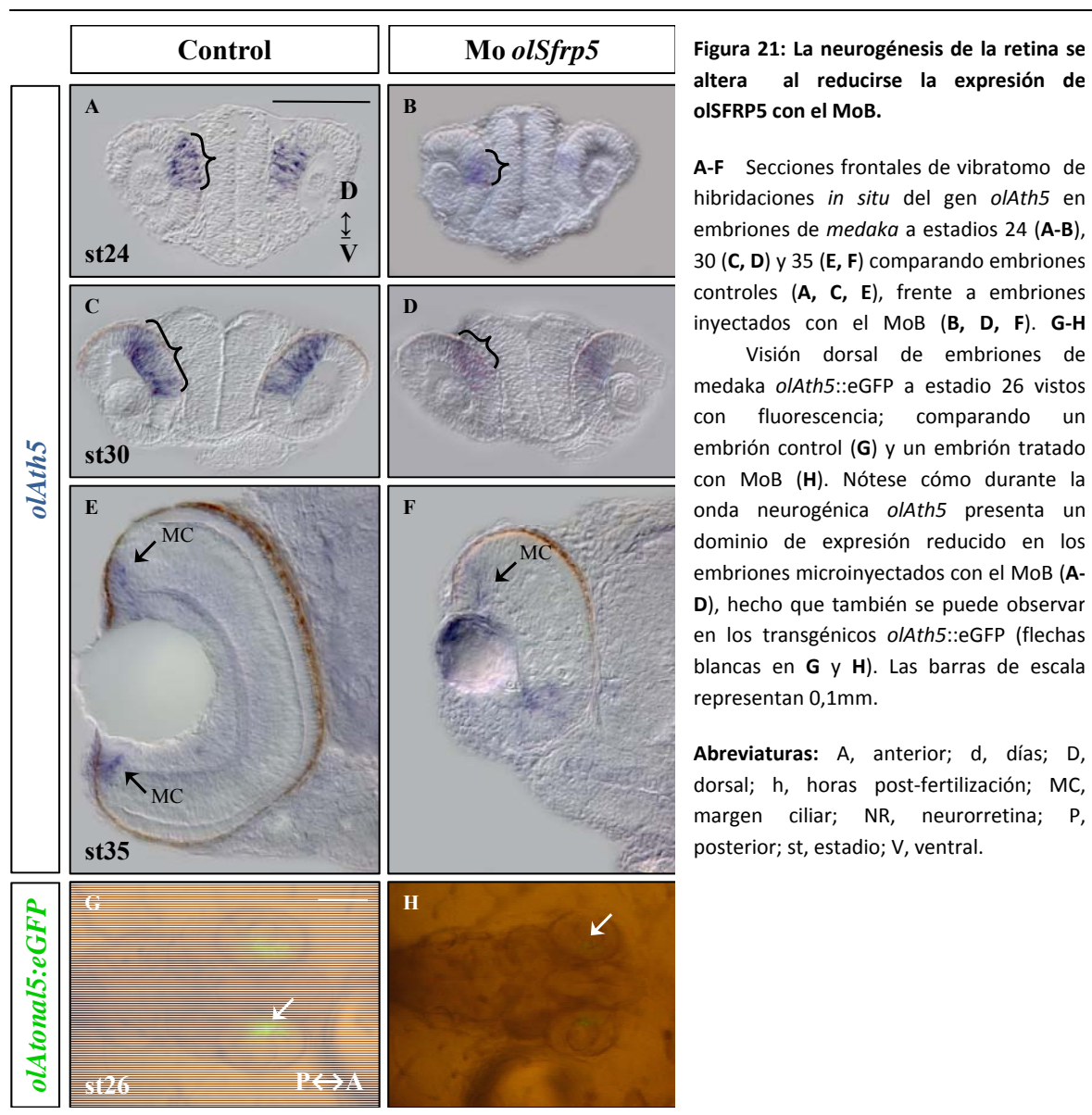


Figura 21: La neurogénesis de la retina se altera al reducirse la expresión de olSFRP5 con el MoB.

A-F Secciones frontales de vibratomo de hibridaciones *in situ* del gen *olAth5* en embriones de *medaka* a estadios 24 (**A-B**), 30 (**C, D**) y 35 (**E, F**) comparando embriones controles (**A, C, E**), frente a embriones inyectados con el MoB (**B, D, F**). **G-H**

Visión dorsal de embriones de *medaka* *olAth5::eGFP* a estadio 26 vistos con fluorescencia; comparando un embrión control (**G**) y un embrión tratado con MoB (**H**). Nótese cómo durante la onda neurogénica *olAth5* presenta un dominio de expresión reducido en los embriones microinyectados con el MoB (**A-D**), hecho que también se puede observar en los transgénicos *olAth5::eGFP* (flechas blancas en **G** y **H**). Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: A, anterior; d, días; D, dorsal; h, horas post-fertilización; MC, margen ciliar; NR, neurorretina; P, posterior; st, estadio; V, ventral.

El factor bHLH Atonal 5 (*olAth5*) se expresa en los progenitores de las RGC, y su expresión se expande desde la región ventronasal hasta la dorsotemporal; restringiéndose finalmente, a las regiones de los márgenes ciliares (**FIG. 21**). Los embriones morfantes presentan un expresión reducida de *olAth5*, indicando que el número de células que comienzan a

diferenciarse es menor (st24: 16/35, 46%; st30: 13/24, 54%). A estadios posteriores la expresión se mantiene en el margen ciliar.

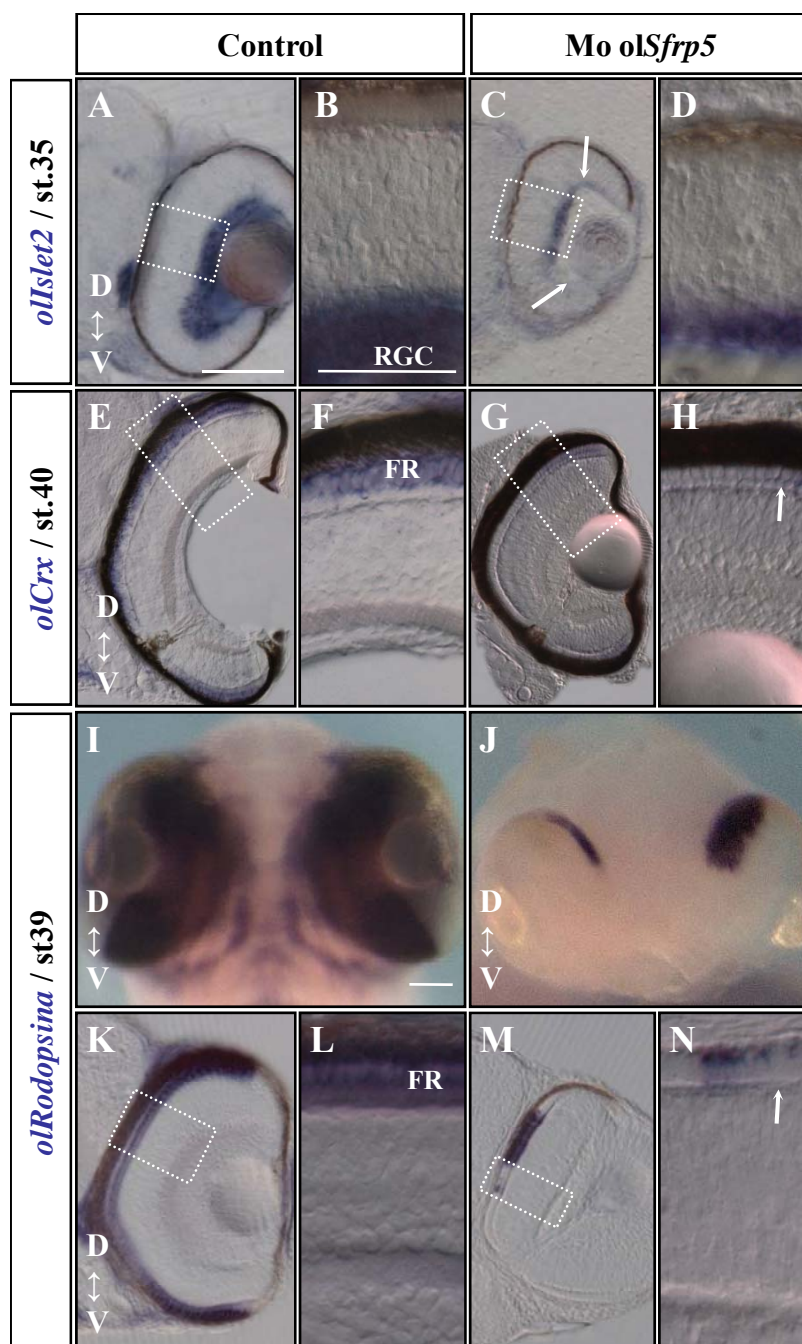


Figura 22: La microinyección del morfolino de *olSfrp5* altera el desarrollo de las RGC y de los fotorreceptores durante la diferenciación de la NR.

Se muestran secciones frontales de vibratomo (A-H, K-M) y visiones dorsales (I, J) de embriones de *medaka* controles (A, B, E, F, I, K, L) e inyectados con el MoB (C, D, G, H, J, LL, M), e hibridados *in toto* con las ribosondas de *ollslet2* (A-D), *olCrx* (E-H) y *olRd* (I-M). El marcador de diferenciación para las RGC *ollslet 2* (A, ampliación en B), reveló que los embriones tratados con MoB poseen un menor número de RGC (C, ampliación en D). Los marcadores de fotorreceptores *olCrx* (E, ampliación en F) y *olRd* (I, K, ampliación en L), dejan de expresarse en los embriones morfantes (G, ampliación en H, J, LL, ampliación en M), indicando que la diferenciación de los fotorreceptores está alterada. Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: D, dorsal; FR, fotorreceptores; RGC, *retinal ganglion cells*; st, estadio; V, ventral.

En las RGC diferenciadas comienza a expresarse el factor de transcripción *ollslet 2* (FIG. 22A, B). En morfantes para *olSfrp5* la expresión de *ollslet2* está muy disminuida indicando una reducción del número de RGC frente a embriones controles (10/20, 50%) (FIG. 22C, D).

El factor de transcripción CRX es fundamental para la especificación y diferenciación de los fotorreceptores. En la retina de embriones controles a estadio 40 *olCrx* se expresa en toda la capa de fotorreceptores (FIG. 22E, F). En cambio, en embriones microinyectados con el morfolino

de *olSfrp5* la expresión de *olCrx* se restringe a pequeños parches de la región dorsal de la retina (10/19, 52%) (**FIG. 22G, H**), indicando una disminución de la especificación de los fotorreceptores.

CRX, junto a otros factores de transcripción del tipo *homeobox* como SIX3, OTX, y a otros del tipo de cremallera de leucina como NRL, son capaces de activar la expresión del gen de la *rodopsina* (*rd*) (Chen et al., 1997; Manavathi et al., 2007; Onorati et al., 2007; Tahayato et al., 2003; Whitaker and Knox, 2004). La RD es la proteína iniciadora de la cascada de fototransducción en los bastones, y en el pez *medaka* se expresa en toda la capa de los fotorreceptores en estadios previos a la eclosión (estadio 37) (**FIG. 22I, K, L**). En embriones morfantes de *olSfrp5* su expresión queda reducida a pequeños parches en las regiones más dorsales del ojo (estadio 37) (**FIG. 22J, LL, M**), confirmando una reducción en la diferenciación de los fotorreceptores (11/15, 73%).

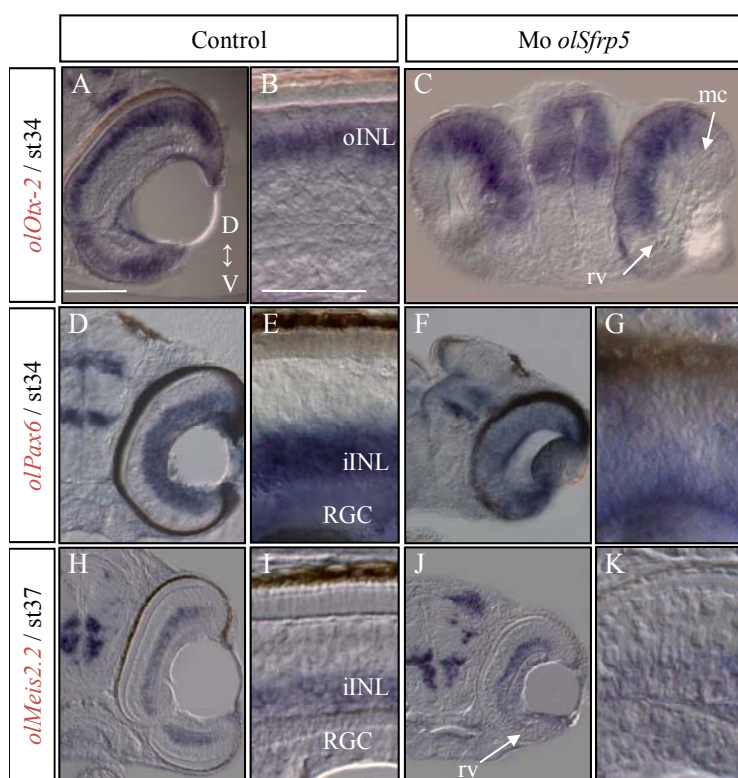


Figura 23: La disminución de la función de SFRP5 modifica el desarrollo de la capa interna de la NR.

Secciones frontales de embriones de *medaka* cortados al vibratomo, controles (**A, B, D, E, H, I**) y microinyectados con el MoB (**C, F, G, J, K**), en los que realizamos hibridaciones *in toto* con las sondas de los factores de transcripción *olOtx2* (**A-C**), *olPax6* (**D-G**) y *olMeis2.2* (**H-K**), en estadios 34 (**A-G**) y 37 (**H-K**). En embriones controles la expresión de *olOtx2* se limita a la oINL (**A**, ampliación en **B**), y en los embriones tratados con MoB la expresión ventral y la dorsal cercana a la región del margen ciliar desaparece totalmente (**C, D**). La expresión de *olPax6* en la RGC e iINL (**E**, ampliación en **F**) se encuentra reducida en embriones morfantes con MoB (**G, H**). La expresión de *olMeis2.2* se reduce en la iINL, sobretodo en la región ventral de la retina. Las barras de escala representan 0,1mm.

Abreviaturas: D, dorsal; iINL *inner inner nuclear layer*; mc, margen ciliar; oINL, *outer inner nuclear layer*; RGC, *retinal ganglion cells*; rv, retina ventral; st, estadio; V, ventral.

Para determinar si otros tipos neuronales en la retina sufrían alteraciones parecidas analizamos la expresión de *olOtx2* un marcador de células bipolares y de *olPax6* y *olMeis2.2* cuya expresión se limita a las células amacrinas y a las RGC (**FIG. 23 A, B, D E, H, I**). En embriones microinyectados con el MoB la expresión de *olOtx2* desaparece de la región ventral de la NR y del margen ciliar (14/26, 54%) (**FIG. 23C**), la expresión de *olPax6* aparece reducida (11/20, 55%) (**FIG. 23 F, G**), y la expresión de *olMeis2.2* se reduce fundamentalmente en la retina ventral (17/31, 55%) (**FIG. 23H-K**).

7.11 SFRP5 es necesario en la formación del techo óptico

A nivel morfológico los embriones tratados con el MoB presentaban alteraciones en la morfogénesis del techo óptico (TO). La especificación temprana del mesencéfalo y del metencéfalo requiere la expresión de genes como *Wnt1*, o los factores de transcripción *Pax2* o *En2* (*Engrailed 2*) (Joyner, 1996). El análisis de los embriones morfantes en estadios tempranos, cuando se regionaliza el sistema nervioso, no mostraba alteraciones de la expresión de *Wnt1* (datos no mostrados) o de *Pax2*, (**FIG. 21A, D**). Para caracterizar molecularmente este defecto analizamos la expresión de diferentes genes en este territorio.

La región parvocelular del TO se hace evidente a medida que sus neuronas se diferencian. Este proceso está marcado por la aparición de la expresión de los factores de transcripción *olPrx3*, *olEmx2* o *olMeis2.2* (**FIG. 26A-D**). En morfantes de *olSfrp5*, estos genes dejan de expresarse o reducen su expresión (*olPrx3*: 19/22, 86%; *olEmx2*: 11/21, 52%; *olMeis2.2*: 17/31, 55%) (**FIG. 26F-I**), indicando que el desarrollo de las células del TO se encuentra alterado.

El factor de transcripción *olOtx2*, cuya zona de expresión se va restringiendo desde todo el TO hasta la región parvocelular (**FIG. 26E**), en embriones microinyectados con el MoB aparece por todo el techo óptico (14/26, 54%), demostrando que su diferenciación se encuentra retrasada (**FIG. 26J**).

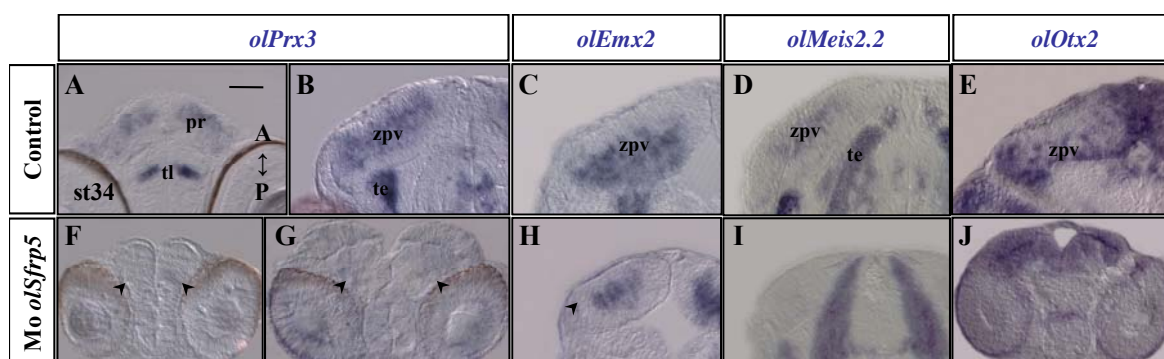


Figura 26: El techo óptico no se diferencia correctamente al disminuirse la función de *olSfrp5* mediante morfolinós en pez *medaka*.

Secciones frontales de vibratomo de embriones de *medaka* controles (**A-E**) e inyectados con MoB (**F-J**), e hibridados *in toto* con las ribosondas de *olPrx3* (**A, B, E, F**), *olEmx2* (**C, G**), *olMeis2.2* (**D, I**) y *olOtx2* (**E, J**). Estos genes se expresan en los embriones controles en la zona parvocelular donde las células del techo se diferencian (**A-E**). En los embriones tratados con el MoB mientras que *olPrx3*, *olEmx2* y *olMeis2.2* reducen su expresión (**F-I**), la expresión de *olOtx2* no se restringe a la región parvocelular. Nótese que en otras regiones del cerebro se mantienen los patrones de expresión de estos marcadores, como *olPrx3* en el telencéfalo (puntas de flecha en **F**) o *olPrx3* y *olEmx2* en el mesencéfalo ventral o *tegmentum* (puntas de flecha en **G** y **H**). La barra de escala representa 0,1mm.

Abreviaturas: D, dorsal; pr, polo rostral; st, estadio; te, *tegmentum*; tl, telencéfalo; V, ventral; zpv, zona parvocelular.

Decidimos estudiar si al igual que ocurría durante el desarrollo del ojo, se encontraban defectos en la proliferación y en la apoptosis (**FIG. 27**). Los resultados indican que en el mesencéfalo a estadios 24-26, la proliferación se encuentra ligeramente reducida en los embriones morfantes con respecto a los controles. Posteriormente, en los embriones controles la proliferación

queda restringida a los márgenes laterales, mediales y rostrales de los lóbulos del techo óptico. Los embriones tratados con el MoB, de forma análoga a lo que ocurría en el ojo, presentan un aumento de la proliferación celular (**FIG. 27A**). De la misma forma que ocurría en el ojo al analizar la expresión de *olCycD1* en los márgenes ciliares, en el TO de los embriones morfantes aumentan la expresión de este gen (**FIG. 27E, H**). En lo que respecta a la apoptosis durante todos los estadios analizados se observan niveles mayores de apoptosis en el techo óptico de los embriones tratados con el morfolino que en los controles, aunque tiende a igualarse en los estadios más tardíos (**FIG. 27B**).

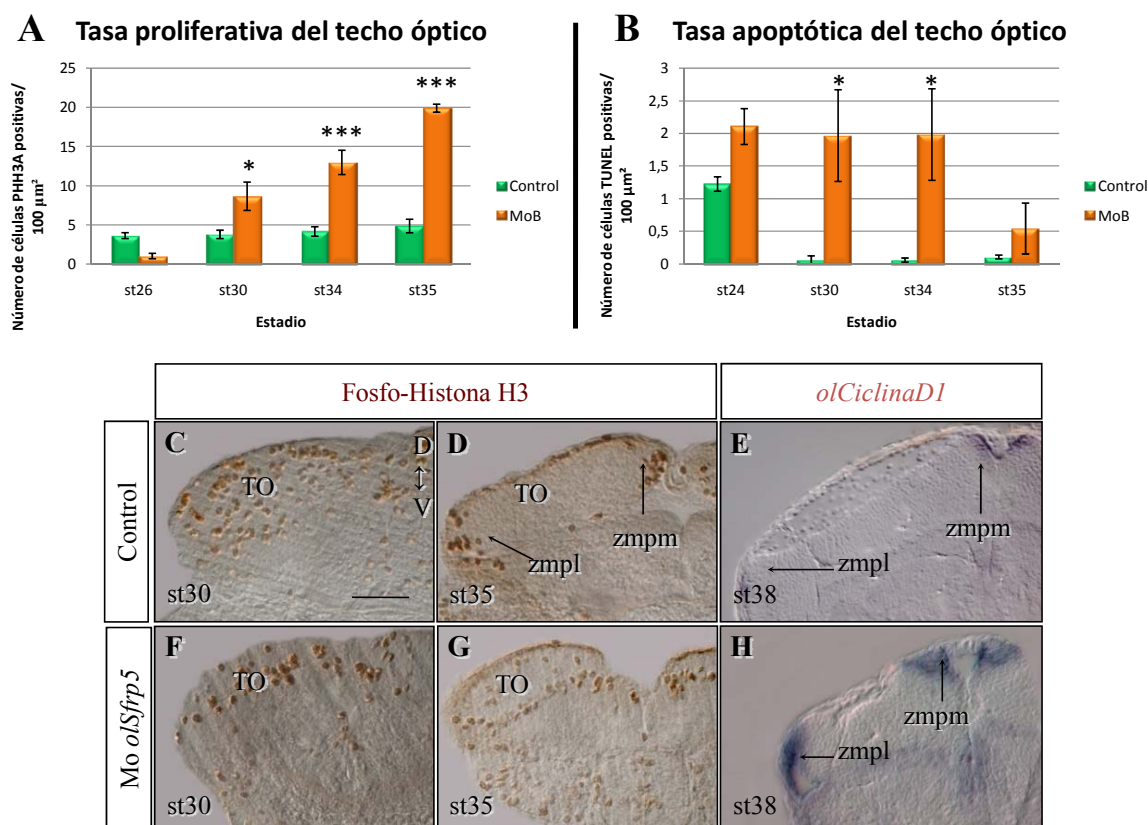


Figura 27: La proliferación y la apoptosis se modifican en los morfantes de SFRP5 durante el desarrollo del techo óptico.

La gráfica en **A** muestra la comparación de la tasa proliferativa entre embriones controles (columnas de color verde) y embriones morfantes para *olSfrp5* (columnas de color naranja), en los estadios st26, st30, st33 y st35. Se cuantifican secciones mediales de los dos lóbulos del TO de al menos 3 embriones de cada estadio. La tasa proliferativa se calcula como el número de células PH3 positivas entre el área del TO. Se puede observar que en los embriones microinyectados con el MoB en estadios tempranos la tasa de proliferación se encuentra reducida (st26), mientras que en los más tardíos aumenta con respecto a los controles (st30-35). La barra de escala representa 0,1mm.

La gráfica en **B** muestra la comparación de la tasa apoptótica entre los embriones controles (columnas verdes) y los embriones tratados con el MoB (columnas naranja) en estadios 24 (1d 20h), 30, 34, y 35. La tasa apoptótica se calcula como el número de células TUNEL positivas entre el área de la sección del TO. Se cuantifican una sección medial de los dos lóbulos del TO de al menos 3 embriones de cada estadio. El test estadístico utilizado en ambos casos es el de Student (***) $P < 0.001$; (*) $P < 0.05$.

C, D, F, G, son secciones frontales de vibratomo de la inmunohistoquímica para PH3 positivas comparando embriones controles (**C, D**) y morfantes de SFRP5 (**F, G**) en estadios 30 (**C, F**) y 35 (**D, G**). **E y H** son secciones frontales de vibratomo en los que hemos realizado una hibridación *in situ* para el gen *olCyclinD1* en estadio 38, comparando un embrión control (**E**) y un morfante de SFRP5 (**H**). Se puede observar el aumento de expresión en las regiones mediales y laterales del lóbulo del TO en el embrión tratado con MoB.

Abreviaturas: d, días; D, dorsal; h, horas post-fertilización; st, estadio; TO, techo óptico; V, ventral; zmpl, zona del margen proliferativo lateral; zmpm, zona del margen proliferativo medial.

Por lo tanto, olSFRP5 parece ser necesario para el desarrollo del mesencéfalo y la correcta diferenciación del techo óptico, puesto que el tratamiento con el morfolino causa apoptosis, lo que explica que sea más pequeño que en los embriones controles.

7.12 Los morfantes de *olSfrp1* pero no los de *olSfrp5* presentan alteraciones en las proyecciones de los axones de las RGC

En estudios anteriores habíamos determinado que SFRP1 funciona como molécula de guía axonal para las RGC en pollo y *Xenopus* (Rodríguez et al., 2005). Ya que *olSfrp1* (FIG. 28) y *olSfrp5* se expresa durante el desarrollo del ojo en algunos lugares importantes en la formación de la vía visual como el disco óptico (FIG. 28), no preguntamos si estas moléculas podrían ejercer un papel similar también en el pez *medaka*.

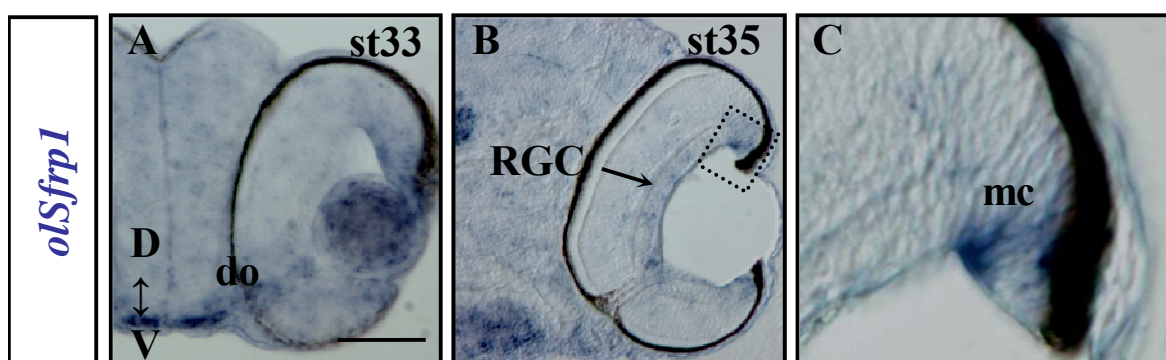


Figura 28: *olSfrp1* se expresa durante el desarrollo ocular.

Secciones frontales de vibratomo de embriones de pez *medaka* que se han hibridado *in toto* con la ribosonda de *olSfrp1* (A-C). *olSfrp1* se expresa en el disco óptico a estadio 33 (A), en las RGC y el margen ciliar a estadio 35 (B, ampliación en C). La barra de escala representa 0,1mm.

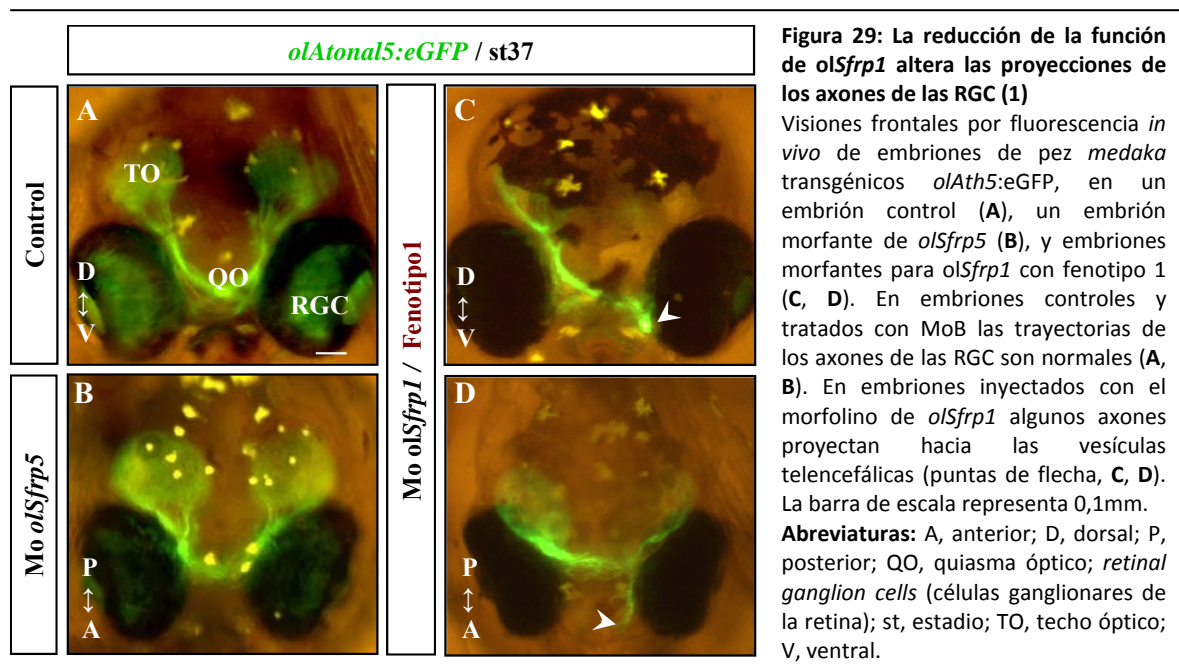
Abreviaturas: D, dorsal; do, disco óptico; mc, margen ciliar; RGC, *retinal ganglion cells* (células ganglionares de la retina); st, estadio; V, ventral.

Para ello, microinyectamos morfolinós de *olSfrp1* y *olSfrp5* en peces transgénicos *olAth5::eGFP* (FIG. 29A) y analizamos los fenotipos de guía axonal resultantes descartando con antelación los embriones con alteraciones en la especificación del establecimiento del patrón embrionario.

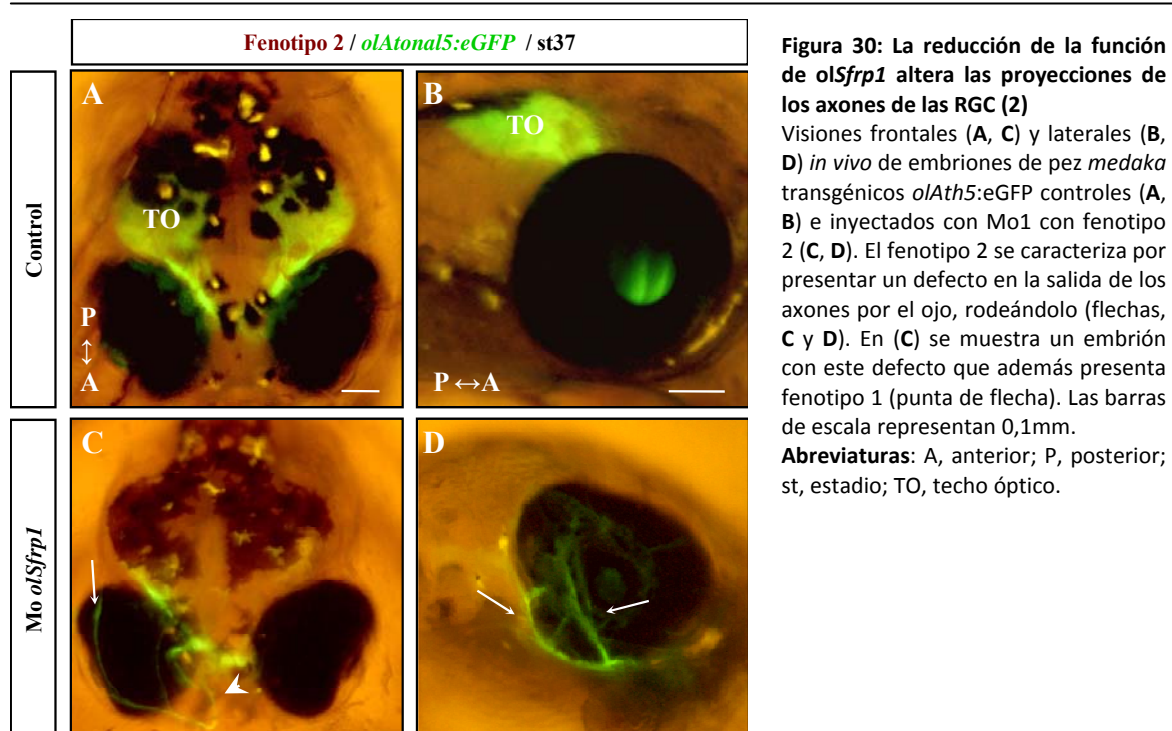
La microinyección del morfolino de *olSfrp5* no provocaba alteraciones en las proyecciones retinotectales, señalando que olSFRP5 no está implicado en la guía de los axones de las RGC (FIG. 29B). Tampoco se encontraron en embriones inyectados con el MoMissMoB, que se utilizaron como control (datos no mostrados).

Sin embargo, la microinyección del morfolino de *olSfrp1* en embriones *olAth5::eGFP* sí provocaba defectos en las proyecciones retino-tectales (26/62, 41%). La mayoría de estos defectos

(17/26, 65%) correspondían a proyecciones anormales hacia las regiones anteriores en las vesículas telencefálicas (fenotipo 1) (FIG. 29).



Un segundo defecto se caracteriza por proyecciones anormales a la altura del disco óptico. En un 27% de los morfantes de *olSFRP1*, los axones, tras su salida por el disco óptico, crecen alrededor del ojo (fenotipo 2, 7/26) (FIG. 30).



En sólo dos embriones encontramos dos fenotipos diferentes: en uno las fibras no llegaban al techo óptico y en el otro los axones se acumulaban en el disco óptico (**FIG. 31**). Ninguno de estos fenotipos fueron observados tras la inyección con un morfolino control con cinco bases desapareadas para *olSfrp1* (datos no mostrados).

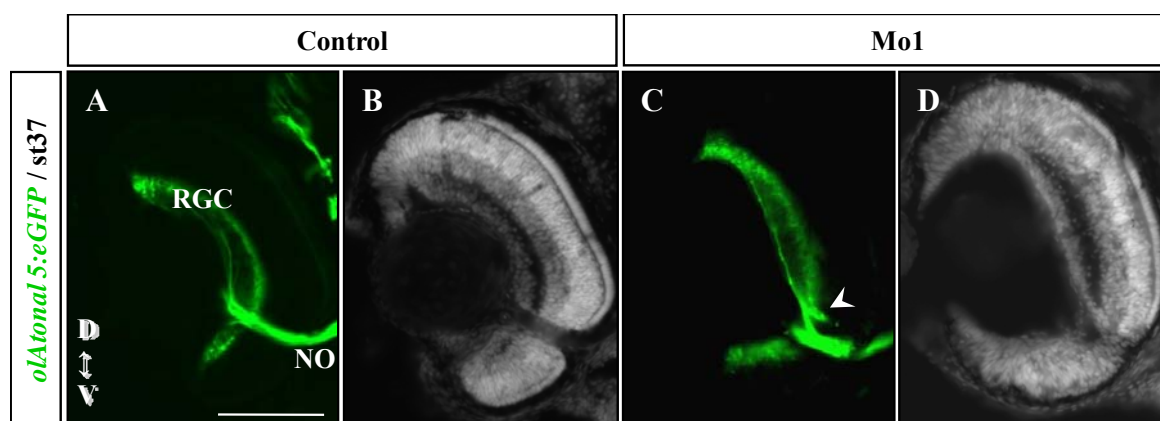
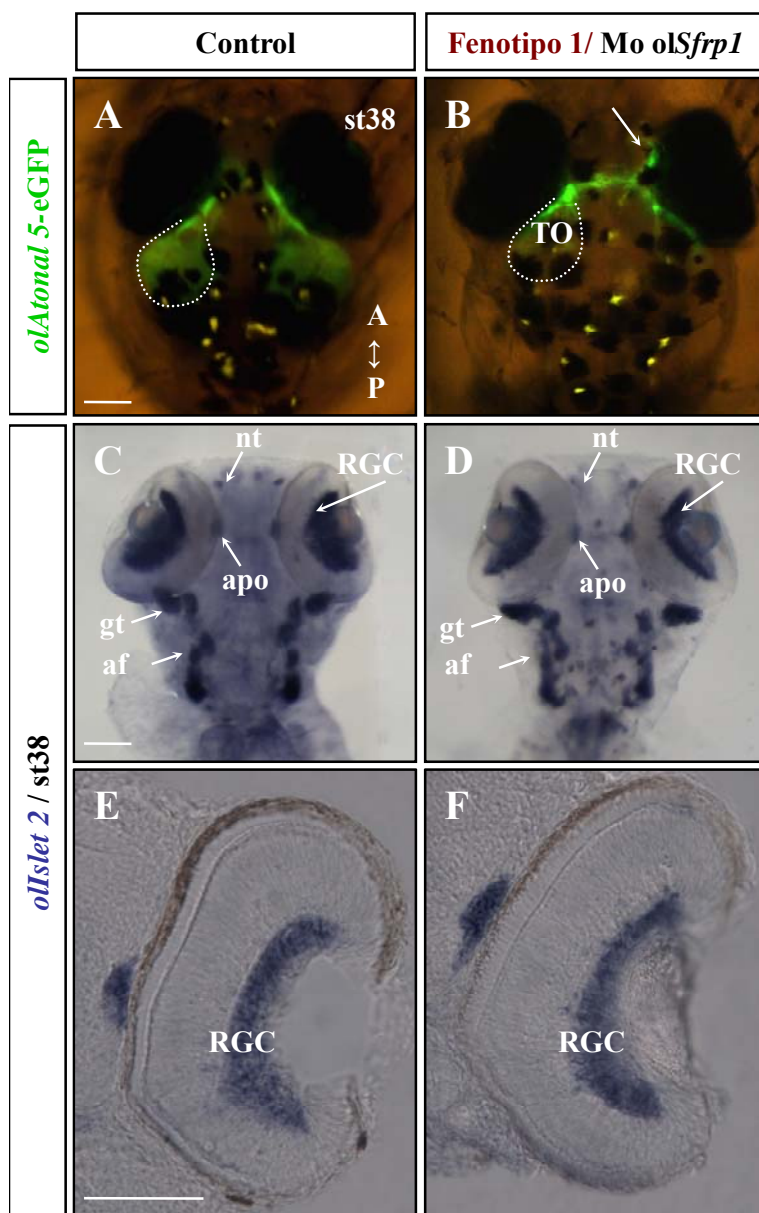


Figura 31: La reducción de la función de *olSfrp1* altera las proyecciones de los axones de las RGCs (y 3)

Secciones frontales de criostato de embriones de pez *medaka* transgénicos *olAth5:eGFP* a nivel del ojo, observadas por fluorescencia, donde se observan las proyecciones de los axones desde las RGCs; comparando embriones controles (**A, B**) e inyectados con Mo1 con fenotipo 3 (**C, D**). Nótese la acumulación de axones anterior a su salida por el disco óptico (punta de flecha, **C**). La tinción nuclear con Hoescht (**B, D**) revela que la estructura laminada de la NR se encuentra correctamente. La barra de escala representa 0,1mm.

Abreviaturas: D, dorsal; RGC, *retinal ganglion cells* (células ganglionares de la retina); NO, nervio óptico; st, estadio; V, ventral.

Para asegurarnos que este fenotipo era un efecto directo de *olSFRP1* sobre el crecimiento axonal, y no a un defecto secundario a la reducción o especificación de las RGC, llevamos a cabo hibridaciones *in situ* para el gen *ollsllet-2*, que se expresa en las RGC y otras regiones del sistema nervioso central (**FIG. 32D, E**). En embriones que presentaban fenotipo de guía axonal la expresión de *ollsllet-2* era normal (**FIG. 32F, G**). Por lo tanto, estos datos apuntarían a que *olSFRP1* podría tener un efecto directo sobre los conos los axones de las RGC.



8. DISCUSIÓN

8.1 El estudio del gen *Sfrp5* en vertebrados

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en estudiar el papel de la proteína SFRP5 durante el desarrollo en el pez *medaka* en dos estructuras en las que se expresa abundantemente: el ojo y el techo óptico (TO). Tanto en el pez cebra como en el pez *medaka*, *Sfrp5* se expresa durante el desarrollo del ojo, TO, hipotálamo o en el tubo digestivo prospectivo. Además, la expresión de *Sfrp5* en el sistema nervioso solapa en parte con la de *Sfrp1*, fundamentalmente en el ojo, TO e hipotálamo (Tendeng and Houart, 2006b), sugiriendo cierta redundancia funcional de estos genes en estos territorios. En otros organismos no se ha descrito expresión de *Sfrp5* ni en la neurorretina (NR) ni en el TO, indicando que en estos organismos otros miembros de la familia de los SFRP podrían ser los encargados de realizar funciones equivalentes. Si bien, durante el desarrollo del ojo, en humano y en ratón, *Sfrp5* sí se expresa en el epitelio pigmentado (RPE) (Chang et al., 1999), aunque no se conoce cuál es la función en este territorio.

En el pez *medaka* no hemos observado expresión de *olSfrp5* durante la gastrulación en la placa neural anterior o en el campo morfogenético del ojo (en donde el parólogo *olSfrp1* se expresa y se necesita para formar el campo de ojo (Esteve et al., 2004)) y sólo en ratón se ha encontrado expresión de *Sfrp5* tan temprana en el endodermo visceral anterior (AVE) (Finley et al., 2003). Los estudios realizados con ratones k.o. indican que SFRP5 junto a SFRP1 y SFRP2 son fundamentales para la formación del eje antero-posterior, postulándose que podrían regular tanto la vía canónica como las vías no canónicas. Aunque el ratón k.o. de SFRP5 no presenta defectos aparentes (Leaf et al., 2006), probablemente debido a la expresión redundante de inhibidores de los WNT en el AVE (Kemp et al., 2005), tanto el ratón triple k.o. de SFRP1-SFRP2-SFRP5, como el ratón doble k.o. de SFRP1-SFRP2 presentan defectos en la formación del tronco y en somitogénesis (Satoh et al., 2006; Satoh et al., 2008), aunque en los ratones triple k.o. estos defectos aparecen más tempranamente que en los ratones doble k.o., indicando que la función de SFRP5 es requerida anteriormente.

Fuera del sistema nervioso la expresión de *Sfrp5* en la región anterior del tubo digestivo se encuentra conservada en ratón, en la región que va a formar el hígado (Finley et al., 2003), y en *Xenopus* (Pilcher and Krieg, 2002). Recientemente se ha descrito que en *Xenopus* SFRP5 es fundamental para inhibir la señalización de WNT, tanto la vía de la β -catenina, como la vía de la PCP, siendo necesario para la especificación y morfogénesis de las células que dan lugar al tubo digestivo anterior (Li et al., 2008).

Nuestros estudios tratan de explicar la función de este gen durante la formación del ojo y del TO, mediante la disminución de la expresión de este gen con morfolinis en el pez *medaka*. A nivel morfológico, el efecto fenotípico visible de los embriones morfantes es la microftalmia y la disminución del tamaño del TO. Los datos funcionales que se conocen de SFRP5 (Chang et al.,

1999; Li et al., 2008) sugieren que esta proteína durante el desarrollo del ojo y del TO podría modular tanto las vías canónicas como las no canónicas de los WNT.

8.2 SFRP5 podría modular los niveles de apoptosis durante el desarrollo del ojo y del TO

Tanto el fenotipo microftálmico como la reducción del tamaño del TO de los morfantes de SFRP5 pueden explicarse por un aumento de los niveles de apoptosis (**FIG. 19, 27**), sugiriendo que SFRP5 podría funcionar como un factor antiapoptótico necesario para controlar el crecimiento de las copas ópticas y del TO.

Diferentes observaciones apoyan el hecho de que algunos miembros de la familia de los SFRP regulan la apoptosis, tanto positiva como negativamente. Cuando se identificaron por primera vez los SFRP, entre otras, se las describió como proteínas secretables relacionadas con la apoptosis, denominadas SARP (Secreted apoptosis related protein) (Melkonyan et al., 1997). En cultivos, SFRP2 (SARP1) protege de la apoptosis a células de adenocarcinoma de pulmón sometidas a estímulos proapoptóticos como TNF (Tumor Necrosis Factor) o ceramidas; mientras que SARP2 (SFRP1) tiene el efecto contrario, promoviendo muerte celular. Durante el desarrollo del romboencéfalo en aves parece que SFRP2 funciona como un protector de la apoptosis. La expresión de *Sfrp2* en los rombómeros pares (r2, r4 y r6) protege a las células de entrar en muerte celular programada (MCP) (Ellies et al., 2000). A diferencia de estos datos SFRP2 también puede desempeñar un papel proapoptótico en las uniones interdigitales durante la formación de las extremidades posteriores ya que los ratones k.o. de *Sfrp2* presentan sindactilia o polisindactilia, con niveles reducidos de muerte celular programada (Ikegawa et al., 2008).

El mecanismo por el que SFRP5 como modulador de la señal de WNT podría regular la apoptosis durante el desarrollo del ojo y del TO es desconocido. Diferentes estudios, fundamentalmente realizados con líneas celulares tumorales, muestran que el efecto antiapoptótico de los SFRP implicaría la inhibición de la señalización por las vías no canónicas (Ellies et al., 2000; Lee et al., 2006; Melkonyan et al., 1997) o la activación de la vía de la β -catenina (Dufourcq et al., 2002; Gehmert et al., 2008; Roth et al., 2000). Estos datos sugieren que SFRP5 podría modular la apoptosis durante el desarrollo del ojo de la misma forma. El análisis del estado de la activación de las vías de WNT en los morfantes de SFRP5 permitirá dilucidar este mecanismo.

Interesantemente, la prevención de la apoptosis por parte de los SFRP podría no limitarse al mecanismo de señalización de WNT sino también a otros mecanismos de señalización celular. La búsqueda en una librería de péptidos de fagos ha revelado que SFRP1 se une con alta afinidad a un motivo peptídico (L/V-VDGRWL/V), ausente en las secuencias aminoácidas de los WNT y de los receptores FZ, pero presente en proteínas como Unc5H3 (Chuman et al., 2004). Unc5H3 (Uncoordinated 5 homolog 3) es uno de los receptores de la molécula de guía axonal Netrina1, y tanto en ratón como en *Xenopus* se expresa durante el desarrollo del ojo (Anderson and Holt, 2002;

Engelkamp, 2002). La activación de Unc5H3 promueve la supervivencia celular e incluso proliferación (Lee et al., 2007), mientras que cuando no hay ningún ligando promueve apoptosis (Arakawa, 2004; Llambi et al., 2001). Una posible especulación es que SFRP5 interaccione con Unc5H3 protegiendo a las células de entrar en apoptosis durante el desarrollo del ojo.

8.3 SFRP5 es necesario para la neurogénesis de la retina y del TO

En los embriones morfantes de *olSfrp5* se aprecia una reducción del número de neuronas diferenciadas tanto en la retina como en el TO (**FIG. 22, 23**), sugiriendo que *olSfrp5* puede tener un papel clave durante la neurogénesis de ambas estructuras.

Como se explicó en la Introducción, la señalización de FGF en el tallo óptico es fundamental para que las células salgan de ciclo y comiencen la diferenciación de las RGC en la retina (Martinez-Morales et al., 2005), y SHH es necesario en la progresión de la diferenciación de estas células (Neumann and Nusslein-Volhard, 2000). En los embriones morfantes no se han encontrado alteraciones de la expresión de estos genes (datos no mostrados), indicando que el mecanismo por el cual SFRP5 facilita la neurogénesis es independiente de estas señales.

Con anterioridad, nuestro laboratorio describió que SFRP1 podría funcionar como una señal de diferenciación sobre el conjunto de progenitores neurales, implicando un mecanismo independiente de la vía de la β -catenina (Esteve et al., 2003). En el pez *medaka* *olSFRP5* podría tener una función parecida, permitiendo la salida de ciclo y la diferenciación de los neuroblastos. Los experimentos de ganancia de función en pollo muestran un aumento de las RGC y de los fotorreceptores (Esteve et al., 2003), mientras que de forma contraria, en los morfantes de *olSfrp5* la diferenciación de estos tipos neuronales disminuyen drásticamente (**FIG. 22**).

En el TO no se conocen las señales inductoras de la neurogénesis, pero la escasa diferenciación presente en los morfantes de SFRP5 muestra que podría funcionar de manera similar que en la NR.

Por otra parte, durante el desarrollo de las copas ópticas, la activación de la vía canónica es necesaria para la formación de los márgenes ciliares (MC). En peces esta estructura contiene células progenitoras capaces de dar lugar a todos los tipos neuronales de la retina (Cho and Cepko, 2006; Kubo et al., 2003; Kubo et al., 2005; Liu et al., 2003; Liu et al., 2007). El análisis de los embriones morfantes sugiere indica que en estas regiones hay un aumento de la proliferación celular. De esta forma, SFRP5 podría actuar como un regulador negativo de la actividad de la vía canónica de los WNT en el MC. La reducción de la expresión de *olSfrp5* sobreactivaría la señal de la vía canónica en esta región, aumentando el número de células que entran en mitosis.

También existe un aumento de la tasa proliferativa durante el desarrollo del TO. Durante la morfogénesis del TO existen dos etapas con altos niveles de proliferación celular: la primera ocurre cuando se ha especificado el territorio, y junto a diferentes movimientos morfogenéticos que se dan

en el mesencéfalo, permite la formación de los lóbulos del TO. La segunda etapa ocurre posteriormente, cuando las células del TO se han diferenciado, encontrándose altos niveles de proliferación en los bordes rostrales, mediales y laterales (Nguyen et al., 1999). El análisis de peces cebrá transgénicos TOPdGFP (que expresan la GFP como gen reportero bajo el control del promotor de elementos de respuesta a la β -catenina) muestra actividad de la vía canónica durante todo el desarrollo del TO (Dorsky et al., 2002). Por lo tanto, SFRP5 podría modular la actividad de la vía canónica en las regiones marginales, de la misma forma que ocurría en los MC de la NR.

8.4 SFRP5 es necesario en la regionalización dorsoventral de la copa óptica, favoreciendo la expresión de genes implicados en el cierre de la fisura óptica

En embriones tratados con MoB la región ventral de las copas ópticas no se especifica correctamente, lo que sugiere que SFRP5 puede tener un papel en la regionalización de la NR. En peces, la señalización mediada por proteínas WNT provenientes del RPE prospectivo permite el mantenimiento de la identidad dorsal de la NR durante el desarrollo de las copas ópticas. La actividad de la vía canónica en el RPE permite el mantenimiento de la señalización por los BMP en la retina dorsal, durante la regionalización de las copas ópticas (Veien et al., 2008). SFRP5 se convierte en un buen candidato para modular la vía canónica desde la región ventral de la copa óptica durante la regionalización de la misma.

En los morfantes, la expresión de factores de transcripción como *Pax2* y *Vax2* se reduce en la región ventral de la retina (**FIG. 21, 22**), ocasionando esporádicamente colobomas oculares (**FIG. 24**). Los colobomas oculares son provocados por defectos en la especificación ventral de la NR (Onwochei et al., 2000; Warburg, 1993); y suelen estar asociados a fenotipos microftálmicos (Gregory-Evans et al., 2004; Onwochei et al., 2000). En humanos mutaciones de PAX2 causa colobomas (Al-Gazali et al., 2000; Sanyanusin et al., 1995), y en otros modelos animales alteraciones de la expresión de PAX2, o de otros factores de transcripción homeobox como los pertenecientes a la familia VAX, producen este fenotipo (Barbieri et al., 2002; Take-uchi et al., 2003). Nuestros datos indican que SFRP5 es necesario para que estos genes se expresen correctamente. Aunque la expresión de *Vax2* y de *Pax2* es dependiente de la señal de SHH desde la línea media ventral (Take-uchi et al., 2003), no hemos observado alteraciones en la expresión de *Shh* en los embriones morfantes de *Sfrp5*, indicando que el mecanismo por el que SFRP5 es requerido para la expresión *Pax2* y *Vax2* es independiente de la señalización de SHH.

8.5 SFRP1 participa en la guía de los axones de las RGC, SFRP5 no

En nuestro laboratorio describimos que en pollo uno de los miembros de la familia de los SFRP, SFRP1, se expresa en puntos cruciales de la vía visual, como en la salida del nervio óptico,

alrededor de la región del quiasma óptico y en la porción inicial del tracto óptico, y funciona como molécula de guía axonal de los axones de las RGC (Rodríguez et al., 2005). La adición de la proteína SFRP1 sobre conos de crecimiento de RGC de *Xenopus* en ensayos de giro del cono de crecimiento, modificaba sus trayectorias (Rodríguez et al., 2005). Este efecto sobre los conos de crecimiento es dependiente de las moléculas presentes en el medio extracelular, generando sobre los conos una respuesta atractiva si se crecen sobre fibronectina, o repulsiva, si se crecen sobre laminina. Experimentos *in vivo* sobre cerebros de *Xenopus* expuestos a la adición de SFRP1 indican que los conos de crecimiento de los axones de las RGC modificaban su recorrido hacia el techo óptico. El hecho de que SFRP5 en el pez *medaka* se expresara también en puntos clave de la vía visual como en el disco y en el techo óptico, hacía suponer que esta proteína pudiera tener funciones de guía axonal.

Por ello analizamos la formación de la vía visual en embriones *olAth5::eGFP* reduciendo la expresión de SFRP5 con morfolinós. También analizamos los morfantes de SFRP1 para comprobar que, efectivamente, esta proteína funcionaba como molécula de guía axonal. Nuestros datos mostraron que la disminución de la expresión de SFRP1 causaba alteraciones en la guía de los axones de las RGC en embriones *olAth5::eGFP* (FIG. 29-31). Puesto que SFRP1 es necesario en diferentes etapas del desarrollo ocular, se tuvo especial cuidado en no afectar la formación del campo de ojo ni de las RGC. Para ello, se inyectó el morfolino para SFRP1 a bajas concentraciones y realizamos hibridaciones *in situ* del marcador *ollsl-2* (FIG. 32), mostrando que el desarrollo de las RGC era similar en los embriones controles. Los resultados de estos experimentos muestran dos tipos de defectos de guía axonal en la salida del ojo y en la subida por el tracto óptico hasta el TO. En *Xenopus* el efecto sobre los conos de crecimiento de SFRP1 está mediado por el dominio CRD, activando al receptor FZ2 de forma independiente de WNT (Rodríguez et al., 2005). Aunque en el pez *medaka* no se ha caracterizado el patrón de expresión de los receptores *Fz*, es probable que *olSfrp1* funcione de forma similar..

A diferencia de *olSfrp1*, los embriones *olAth5::eGFP* microinyectados con MoB no presentaban alteraciones en la guía de los axones de las RGC, indicando que SFRP5 no contribuyen a la guía de los axones de las RGC.

8.6 SFRP5 es necesario para el correcto desarrollo del ojo y del techo óptico en el pez *medaka*.

En este trabajo hemos puesto de relieve que SFRP5 puede tener diferentes funciones durante el desarrollo del ojo y del TO. El estudio de los embriones morfantes de SFRP5 de pez *medaka* permite especular sobre los posibles mecanismos de funcionamiento de esta proteína.

Por una parte, parece que SFRP5 podría funcionar como un modulador negativo de la actividad de la vía canónica de los WNT durante la regionalización de las copas ópticas (Veien et al., 2008),

o controlando los niveles de proliferación de los márgenes ciliares (Cho and Cepko, 2006; Kubo et al., 2003; Kubo et al., 2005; Liu et al., 2003; Liu et al., 2007) o del techo óptico (Dorsky et al., 2002).

Por otra parte, SFRP5 también parece ser necesario para la neurogénesis de la retina, sugiriendo que el funcionamiento pueda ser independiente de la señalización canónica de los WNT, si SFRP5 se comportara igual que SFRP1 (Esteve et al., 2003).

Sin embargo el papel de SFRP5 como modulador de la apoptosis es más complejo de explicar. El efecto protector que los SFRP pueden conferir a las células bien puede explicarse por un aumento de la actividad de las vías no canónicas (Ellies et al., 2000; Lee et al., 2006; Melkonyan et al., 1997) o por una disminución de la actividad de la vía canónica (Dufourcq et al., 2002; Gehmert et al., 2008; Roth et al., 2000). El efecto fenotípico de aumento de la apoptosis en los embriones se observa al formarse las vesículas ópticas, donde no ha detectado en peces actividad de la vía canónica (Dorsky et al., 2002). Estos datos parecen sugerir que durante estos estadios tempranos el SFRP5 pueda regular la actividad de las vías no canónicas. Alternativamente, la regulación por parte de los SFRP de los procesos apoptóticos podría realizarse fuera del contexto de la señalización de WNT, por la posible capacidad que tienen estas proteínas de unirse al receptor de Netrina1, Unc5H3 (Lee et al., 2007).

Futuros experimentos del estado de activación de la vía de los WNT determinarán los mecanismos por el que SFRP5 funciona durante el desarrollo del ojo y del techo óptico.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el transcurso de este trabajo han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. *olSfrp5* se expresa de forma dinámica durante el desarrollo embrionario en el primordio ocular, el techo óptico, el hipotálamo, las vesículas óticas y el primordio del tubo digestivo.
2. Niveles reducidos de SFRP5 causan muerte celular en las células de la retina y del techo óptico, llevando a una reducción del tamaño de los mismos.
3. Como resultado de la reducción del tamaño del ojo, en los morfantes de *olSfrp5* la tasa de proliferación celular aumenta de forma aparente, tanto en retina como techo óptico.
4. Como consecuencia de la reducción de la expresión de *Sfrp5*, las regiones ventrales de la copa óptica no se especifican correctamente, causando ocasionalmente colobomas
5. SFRP5 participa en la neurogénesis de la retina
6. SFRP5 es necesario para la neurogénesis y diferenciación del techo óptico
7. SFRP1 participa en el establecimiento de las vías visuales, función que SFRP5 no comparte.

10.BIBLIOGRAFÍA

- Adell, T., Thakur, A. N. and Muller, W. E.** (2007). Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. *Cell Biol Int* **31**, 939-49.
- Adler, R. and Canto-Soler, M. V.** (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol* **305**, 1-13.
- Al-Gazali, L. I., Bakir, M., Hamid, Z. M., Nair, D. K., Haas, D., Amirlak, I. and Rushdi, A.** (2000). A new syndrome of optic nerve colobomas and renal abnormalities associated with arthrogryposis multiplex. *Clin Dysmorphol* **9**, 183-8.
- Anderson, R. B. and Holt, C. E.** (2002). Expression of UNC-5 in the developing *Xenopus* visual system. *Mech Dev* **118**, 157-60.
- Arakawa, H.** (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 978-87.
- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A. and Aaronson, S. A.** (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**, 16180-7.
- Bailey, T. J., El-Hodiri, H., Zhang, L., Shah, R., Mathers, P. H. and Jamrich, M.** (2004). Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol* **48**, 761-70.
- Banyai, L. and Patthy, L.** (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci* **8**, 1636-42.
- Barallobre, M. J., Pascual, M., Del Rio, J. A. and Soriano, E.** (2005). The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 22-47.
- Barbieri, A. M., Broccoli, V., Bovolenta, P., Alfano, G., Marchitelli, A., Mochetti, C., Crippa, L., Bulfone, A., Marigo, V., Ballabio, A. et al.** (2002). Vax2 inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma. *Development* **129**, 805-13.
- Barishak, R. Y. and Ofri, R.** (2007). Embryogenetics: gene control of the embryogenesis of the eye. *Vet Ophthalmol* **10**, 133-6.
- Baye, L. M. and Link, B. A.** (2007a). Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J Neurosci* **27**, 10143-52.
- Baye, L. M. and Link, B. A.** (2007b). Nuclear migration during retinal development. *Brain Res.*
- Berndt, T. and Kumar, R.** (2007). Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol* **69**, 341-59.
- Bodine, P. V. and Komm, B. S.** (2006). Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 33-9.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.

- Bovolenta, P.** (2005). Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J Neurobiol* **64**, 405-16.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J.** (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* **121**, 737-46.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L. and Boncinelli, E.** (1998). Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech Dev* **70**, 201-3.
- Bovolenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P.** (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399-408.
- Bradley, L., Sun, B., Collins-Racie, L., LaVallie, E., McCoy, J. and Sive, H.** (2000). Different activities of the frizzled-related proteins frzb2 and sizzled2 during *Xenopus* anteroposterior patterning. *Dev Biol* **227**, 118-32.
- Cadigan, K. M. and Liu, Y. I.** (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* **119**, 395-402.
- Cavodeassi, F., Carreira-Barbosa, F., Young, R. M., Concha, M. L., Allende, M. L., Houart, C., Tada, M. and Wilson, S. W.** (2005). Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway. *Neuron* **47**, 43-56.
- Collavin, L. and Kirschner, M. W.** (2003). The secreted Frizzled-related protein Sizzled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. *Development* **130**, 805-16.
- Chang, J. T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G. et al.** (1999). Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* **8**, 575-83.
- Chapman, S. C., Brown, R., Lees, L., Schoenwolf, G. C. and Lumsden, A.** (2004). Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. *Dev Dyn* **229**, 668-76.
- Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Zack, D. J.** (1997). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**, 1017-30.
- Cho, S. H. and Cepko, C. L.** (2006). Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* **133**, 3167-77.
- Chong, J. M., Uren, A., Rubin, J. S. and Speicher, D. W.** (2002). Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J Biol Chem* **277**, 5134-44.
- Chow, R. L. and Lang, R. A.** (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 255-96.
- Chuang, J. C. and Raymond, P. A.** (2002). Embryonic origin of the eyes in teleost fish. *Bioessays* **24**, 519-29.
- Chuman, Y., Uren, A., Cahill, J., Regan, C., Wolf, V., Kay, B. K. and Rubin, J. S.** (2004). Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1. *Peptides* **25**, 1831-8.

- Davidson, G., Mao, B., del Barco Barrantes, I. and Niehrs, C.** (2002). Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development* **129**, 5587-96.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M. et al.** (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-67.
- Del Bene, F., Ettwiller, L., Skowronska-Krawczyk, D., Baier, H., Matter, J. M., Birney, E. and Wittbrodt, J.** (2007). In vivo validation of a computationally predicted conserved *Ath5* target gene set. *PLoS Genet* **3**, 1661-71.
- Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M. and Vleminckx, K.** (2008). Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells* **26**, 2063-74.
- Dorsky, R. I., Sheldahl, L. C. and Moon, R. T.** (2002). A transgenic *Lef1*/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Dev Biol* **241**, 229-37.
- Dufourcq, P., Couffignal, T., Ezan, J., Barandon, L., Moreau, C., Daret, D. and Duplaa, C.** (2002). FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response. *Circulation* **106**, 3097-103.
- Eisen, J. S. and Smith, J. C.** (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*.
- Ekker, S. C.** (2000). Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* **17**, 302-306.
- Ellies, D. L., Church, V., Francis-West, P. and Lumsden, A.** (2000). The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development* **127**, 5285-95.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-71.
- Engelkamp, D.** (2002). Cloning of three mouse *Unc5* genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev* **118**, 191-7.
- England, S. J., Blanchard, G. B., Mahadevan, L. and Adams, R. J.** (2006). A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* **133**, 4613-7.
- Erskine, L. and Herrera, E.** (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* **308**, 1-14.
- Erskine, L., Williams, S. E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R. A., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Mason, C. A.** (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of *robo*s and *slits*. *J Neurosci* **20**, 4975-82.
- Esteve, P. and Bovolenta, P.** (2006). Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 13-9.
- Esteve, P., Lopez-Rios, J. and Bovolenta, P.** (2004). SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mech Dev* **121**, 687-701.

- Esteve, P., Morcillo, J. and Bovolenta, P.** (2000). Early and dynamic expression of cSfrp1 during chick embryo development. *Mech Dev* **97**, 217-21.
- Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J. and Bovolenta, P.** (2003). SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J Cell Sci* **116**, 2471-81.
- Finch, P. W., He, X., Kelley, M. J., Uren, A., Schaudies, R. P., Popescu, N. C., Rudikoff, S., Aaronson, S. A., Varmus, H. E. and Rubin, J. S.** (1997). Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6770-5.
- Finley, K. R., Tennessen, J. and Shawlot, W.** (2003). The mouse secreted frizzled-related protein 5 gene is expressed in the anterior visceral endoderm and foregut endoderm during early post-implantation development. *Gene Expr Patterns* **3**, 681-4.
- Forrester, W. C., Kim, C. and Garriga, G.** (2004). The *Caenorhabditis elegans* Ror RTK CAM-1 inhibits EGL-20/Wnt signaling in cell migration. *Genetics* **168**, 1951-62.
- Fu, X., Sun, H., Klein, W. H. and Mu, X.** (2006). Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* **299**, 424-37.
- Fujisawa, H.** (2004). Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* **59**, 24-33.
- Furutani-Seiki, M. and Wittbrodt, J.** (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev* **121**, 629-37.
- Garcia-Hoyos, M., Cantalapiedra, D., Arroyo, C., Esteve, P., Rodriguez, J., Riveiro, R., Trujillo, M. J., Ramos, C., Bovolenta, P. and Ayuso, C.** (2004). Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies. *Mol Vis* **10**, 426-31.
- Gehmert, S., Sadat, S., Song, Y. H., Yan, Y. and Alt, E.** (2008). The anti-apoptotic effect of IGF-1 on tissue resident stem cells is mediated via PI3-kinase dependent secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) release. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 752-5.
- Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* **389**, 517-9.
- Gordon, M. D. and Nusse, R.** (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**, 22429-33.
- Green, J. L., Inoue, T. and Sternberg, P. W.** (2007). The *C. elegans* ROR receptor tyrosine kinase, CAM-1, non-autonomously inhibits the Wnt pathway. *Development* **134**, 4053-62.
- Gregory-Evans, C. Y., Williams, M. J., Halford, S. and Gregory-Evans, K.** (2004). Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *J Med Genet* **41**, 881-91.
- Gripp, K. W., Wotton, D., Edwards, M. C., Roessler, E., Ades, L., Meinecke, P., Richieri-Costa, A., Zackai, E. H., Massague, J., Muenke, M. et al.** (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* **25**, 205-8.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-32.

- Gurdon, J. B. and Bourillot, P. Y.** (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature* **413**, 797-803.
- Halford, M. M. and Stacker, S. A.** (2001). Revelations of the RYK receptor. *Bioessays* **23**, 34-45.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. and Kageyama, R.** (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-22.
- Hauptmann, G.** (1994). Two color whole-mount in situ hybridization. *The Zebrafish Science Monitor* **3**, 4-6.
- Hausler, K. D., Horwood, N. J., Chuman, Y., Fisher, J. L., Ellis, J., Martin, T. J., Rubin, J. S. and Gillespie, M. T.** (2004). Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* **19**, 1873-81.
- Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R. et al.** (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev* **15**, 1427-34.
- Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C. and Wilson, S. W.** (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81.
- Hino, K., Satou, Y., Yagi, K. and Satoh, N.** (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGFbeta, Hedgehog and JAK/STAT signaling pathways. *Dev Genes Evol* **213**, 264-72.
- Hoang, B., Moos, M., Jr., Vukicevic, S. and Luyten, F. P.** (1996). Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem* **271**, 26131-7.
- Hopker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. and Holt, C.** (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* **401**, 69-73.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S.** (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-65.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B. and Nathans, J.** (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-6.
- Hu, M. and Easter, S. S.** (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* **207**, 309-21.
- Ikegawa, M., Han, H., Okamoto, A., Matsui, R., Tanaka, M., Omi, N., Miyamae, M., Toguchida, J. and Tashiro, K.** (2008). Syndactyly and preaxial synpolydactyly in the single *Sfrp2* deleted mutant mice. *Dev Dyn* **237**, 2506-17.
- Illies, M. R., Peeler, M. T., Dechtiaruk, A. and Ettensohn, C. A.** (2002). Cloning and developmental expression of a novel, secreted frizzled-related protein from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mech Dev* **113**, 61-4.

- Itoh, K., Lisovsky, M., Hikasa, H. and Sokol, S. Y.** (2005). Reorganization of actin cytoskeleton by FRIED, a Frizzled-8 associated protein tyrosine phosphatase. *Dev Dyn* **234**, 90-101.
- Iwamatsu, T.** (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev* **121**, 605-18.
- Jasoni, C., Hendrickson, A. and Roelink, H.** (1999). Analysis of chicken Wnt-13 expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction. *Dev Dyn* **215**, 215-24.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.
- Jones, S. E. and Jomary, C.** (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**, 811-20.
- Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. and Neal, M. J.** (2000). Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* **11**, 3963-7.
- Joyner, A. L.** (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet* **12**, 15-20.
- Kawano, Y. and Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L. and Leyns, L.** (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev Dyn* **233**, 1064-75.
- Kenyon, K. L., Zaghloul, N. and Moody, S. A.** (2001). Transcription factors of the anterior neural plate alter cell movements of epidermal progenitors to specify a retinal fate. *Dev Biol* **240**, 77-91.
- Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. and Chitnis, A. B.** (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.
- Kim, S. H., Shin, J., Park, H. C., Yeo, S. Y., Hong, S. K., Han, S., Rhee, M., Kim, C. H., Chitnis, A. B. and Huh, T. L.** (2002). Specification of an anterior neuroectoderm patterning by Frizzled8a-mediated Wnt8b signalling during late gastrulation in zebrafish. *Development* **129**, 4443-55.
- Kitambi, S. S. and Malicki, J. J.** (2008). Spatiotemporal features of neurogenesis in the retina of medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* **237**, 3870-81.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J. K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K. et al.** (2000). Tbx5 and the retinotectum projection. *Science* **287**, 134-7.
- Kubo, F., Takeichi, M. and Nakagawa, S.** (2003). Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* **130**, 587-98.
- Kubo, F., Takeichi, M. and Nakagawa, S.** (2005). Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development* **132**, 2759-70.

- Kuhl, M.** (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* **9**, 967-74.
- Ladher, R. K., Church, V. L., Allen, S., Robson, L., Abdelfattah, A., Brown, N. A., Hattersley, G., Rosen, V., Luyten, F. P., Dale, L. et al.** (2000). Cloning and expression of the Wnt antagonists Sfrp-2 and Frzb during chick development. *Dev Biol* **218**, 183-98.
- Lang, R. A.** (2004). Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol* **48**, 783-91.
- Lapraz, F., Rottinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Wu, S. Y., Bradham, C., Loza, M. A., Hibino, T. et al.** (2006). RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* **300**, 132-52.
- Leaf, I., Tennesen, J., Mukhopadhyay, M., Westphal, H. and Shawlot, W.** (2006). Sfrp5 is not essential for axis formation in the mouse. *Genesis* **44**, 573-8.
- Lee, A. Y., He, B., You, L., Dadfarmay, S., Xu, Z., Mazieres, J., Mikami, I., McCormick, F. and Jablons, D. M.** (2004). Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* **23**, 6672-6.
- Lee, H. K., Seo, I. A., Seo, E., Seo, S. Y., Lee, H. J. and Park, H. T.** (2007). Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through Unc5b receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 1057-62.
- Lee, J. L., Chang, C. J., Chueh, L. L. and Lin, C. T.** (2006). Secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) decreases susceptibility to UV-induced apoptosis in primary culture of canine mammary gland tumors by NF-kappaB activation or JNK suppression. *Breast Cancer Res Treat* **100**, 49-58.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-94.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S. and De Robertis, E. M.** (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-56.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. and Rao, Y.** (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* **124**, 603-15.
- Li, S., Mo, Z., Yang, X., Price, S. M., Shen, M. M. and Xiang, M.** (2004). Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* **43**, 795-807.
- Li, Y., Rankin, S. A., Sinner, D., Kenny, A. P., Krieg, P. A. and Zorn, A. M.** (2008). Sfrp5 coordinates foregut specification and morphogenesis by antagonizing both canonical and noncanonical Wnt11 signaling. *Genes Dev* **22**, 3050-63.
- Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D. and Wallace, V. A.** (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* **227**, 323-34.
- Liu, H., Thurig, S., Mohamed, O., Dufort, D. and Wallace, V. A.** (2006). Mapping canonical Wnt signaling in the developing and adult retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 5088-97.
- Liu, H., Xu, S., Wang, Y., Mazerolle, C., Thurig, S., Coles, B. L., Ren, J. C., Taketo, M. M., van der Kooy, D. and Wallace, V. A.** (2007). Ciliary margin transdifferentiation from neural retina is controlled by canonical Wnt signaling. *Dev Biol* **308**, 54-67.

- Loosli, F., Koster, R. W., Carl, M., Krone, A. and Wittbrodt, J.** (1998). Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev* **74**, 159-64.
- Lopez-Rios, J., Esteve, P., Ruiz, J. M. and Bovolenta, P.** (2008a). The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Develop* **3**, 19.
- Lopez-Rios, J., Esteve, P., Ruiz, J. M. and Bovolenta, P.** (2008b). The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Develop* **3**, 19.
- Lopez-Rios, J., Gallardo, M. E., Rodriguez de Cordoba, S. and Bovolenta, P.** (1999). Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mech Dev* **83**, 155-9.
- Luo, L.** (2006). Developmental neuroscience: two gradients are better than one. *Nature* **439**, 23-4.
- Lupo, G., Andreazzoli, M., Gestri, G., Liu, Y., He, R. Q. and Barsacchi, G.** (2000). Homeobox genes in the genetic control of eye development. *Int J Dev Biol* **44**, 627-36.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. and Mehlen, P.** (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* **20**, 2715-22.
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. and Wilson, S. W.** (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* **121**, 3267-78.
- Malbon, C. C. and Wang, H. Y.** (2006). Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. *Curr Top Dev Biol* **72**, 153-66.
- Manavathi, B., Peng, S., Rayala, S. K., Talukder, A. H., Wang, M. H., Wang, R. A., Balasenthil, S., Agarwal, N., Frishman, L. J. and Kumar, R.** (2007). Repression of Six3 by a corepressor regulates rhodopsin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13128-33.
- Mann, F., Harris, W. A. and Holt, C. E.** (2004). New views on retinal axon development: a navigation guide. *Int J Dev Biol* **48**, 957-64.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C. et al.** (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7.
- Marikawa, Y.** (2006). Wnt/beta-catenin signaling and body plan formation in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 175-84.
- Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P. and Wittbrodt, J.** (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Dev Cell* **8**, 565-74.
- Martinez-Morales, J. R., Rodrigo, I. and Bovolenta, P.** (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays* **26**, 766-77.
- Martinez, S.** (2001). The isthmic organizer and brain regionalization. *Int J Dev Biol* **45**, 367-71.

- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H. and Wilson, S. W.** (2000). Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* **27**, 251-63.
- Masai, I., Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A. and Okamoto, H.** (2005). The hedgehog-PKA pathway regulates two distinct steps of the differentiation of retinal ganglion cells: the cell-cycle exit of retinoblasts and their neuronal maturation. *Development* **132**, 1539-53.
- McAvoy, J. W.** (1980). Cytoplasmic processes interconnect lens placode and optic vesicle during eye morphogenesis. *Exp Eye Res* **31**, 527-34.
- McFarlane, S., McNeill, L. and Holt, C. E.** (1995). FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron* **15**, 1017-28.
- McLaughlin, T., Hindges, R. and O'Leary, D. D.** (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 57-69.
- Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P. A., Kiefer, M. C., Tomei, L. D. and Umansky, S. R.** (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13636-41.
- Messier, P. E.** (1978). Microtubules, interkinetic nuclear migration and neurulation. *Experientia* **34**, 289-96.
- Messier, P. E. and Auclair, C.** (1975). [Neurulation and interkinetic nuclear migration in the chick embryo (author's transl)]. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 339-54.
- Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006a). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* **4**, e115.
- Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006b). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* **25**, 7461-8.
- Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. and Moon, R. T.** (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* **18**, 7860-72.
- Moore, K. B., Mood, K., Daar, I. O. and Moody, S. A.** (2004). Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Dev Cell* **6**, 55-67.
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M. and Strahle, U.** (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* **127**, 3889-97.
- Nakagawa, S., Takada, S., Takada, R. and Takeichi, M.** (2003). Identification of the laminar-inducing factor: Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro. *Dev Biol* **260**, 414-25.
- Nasevicius, A. and Ekker, S. C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-20.
- Neumann, C. J. and Nusslein-Volhard, C.** (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* **289**, 2137-9.

Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J. S., Wittbrodt, J., Chourrout, D. and Bourrat, F. (1999). Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *J Comp Neurol* **413**, 385-404.

Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J. P., Krauss, S. and Johansen, T. (1998). Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* **77**, 185-96.

O'Leary, D. D. and McLaughlin, T. (2005). Mechanisms of retinotopic map development: Ephs, ephrins, and spontaneous correlated retinal activity. *Prog Brain Res* **147**, 43-65.

Ohsawa, R. and Kageyama, R. (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* **1192**, 90-8.

Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045-55.

Onorati, M., Cremisi, F., Liu, Y., He, R. Q., Barsacchi, G. and Vignali, R. (2007). A specific box switches the cell fate determining activity of XOTX2 and XOTX5b in the Xenopus retina. *Neural Develop* **2**, 12.

Onwochei, B. C., Simon, J. W., Bateman, J. B., Couture, K. C. and Mir, E. (2000). Ocular colobomata. *Surv Ophthalmol* **45**, 175-94.

Pandur, P., Maurus, D. and Kuhl, M. (2002). Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays* **24**, 881-4.

Pezeron, G., Anselme, I., Laplante, M., Ellingsen, S., Becker, T. S., Rosa, F. M., Charnay, P., Schneider-Maunoury, S., Mourrain, P. and Ghislain, J. (2006). Duplicate sfrp1 genes in zebrafish: sfrp1a is dynamically expressed in the developing central nervous system, gut and lateral line. *Gene Expr Patterns* **6**, 835-42.

Pfeffer, P. L., De Robertis, E. M. and Izpisua-Belmonte, J. C. (1997). Crescent, a novel chick gene encoding a Frizzled-like cysteine-rich domain, is expressed in anterior regions during early embryogenesis. *Int J Dev Biol* **41**, 449-58.

Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M. and Busslinger, M. (1998). Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development* **125**, 3063-74.

Pilcher, K. E. and Krieg, P. A. (2002). Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of Xenopus. *Gene Expr Patterns* **2**, 369-72.

Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., Zhe, L., Mambetisaeva, E., Annan, A., Bannister, L. et al. (2008). Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Mol Cell Neurosci* **37**, 719-30.

Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., Mason, C. A. and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* **33**, 219-32.

- Porges, Y., Gershoni-Baruch, R., Leib, R., Goldscher, D., Zonis, S., Shapira, I. and Miller, B.** (1992). Hereditary microphthalmia with colobomatous cyst. *Am J Ophthalmol* **114**, 30-4.
- Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R. and Ramirez, G.** (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* **3**, 559-569.
- Ramón y Cajal, S.** (1888a). Estructura de la retina de las aves. *Revista trimestral de Histología normal y patológica* **11**.
- Ramón y Cajal, S.** (1888b). Morfología y conexiones de los elementos de la retina de las aves. *Revista trimestral de Histología normal y patológica* **10**.
- Ramón y Cajal, S.** (1891). Notas preventivas sobre la retina y gran simpático de los mamíferos. *Gaceta Sanitaria de Barcelona*.
- Ramón y Cajal, S.** (1892a). La retina de los teleósteos y algunas observaciones sobre la de los vertebrados superiores, (ed.: Sociedad de Historia Natural).
- Ramón y Cajal, S.** (1892b). La rétine des vertébrés. In *La Cellule*, vol. IX, pp. 119–258.
- Rasmussen, J. T., Deardorff, M. A., Tan, C., Rao, M. S., Klein, P. S. and Vetter, M. L.** (2001). Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3861-6.
- Rattner, A., Hsieh, J. C., Smallwood, P. M., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, J.** (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2859-63.
- Rehn, M. and Pihlajaniemi, T.** (1995). Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. The longest form contains a novel motif homologous to rat and *Drosophila* frizzled proteins. *J Biol Chem* **270**, 4705-11.
- Rembold, M., Loosli, F., Adams, R. J. and Wittbrodt, J.** (2006). Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination. *Science* **313**, 1130-4.
- Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A. and Ekker, S. C.** (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* **3**, e78.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J. M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. and Bovolenta, P.** (2005). SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* **8**, 1301-9.
- Roth, W., Wild-Bode, C., Platten, M., Grimm, C., Melkonyan, H. S., Dichgans, J. and Weller, M.** (2000). Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene* **19**, 4210-20.
- Rubin, J. S., Barshishat-Kupper, M., Feroze-Merzoug, F. and Xi, Z. F.** (2006). Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Front Biosci* **11**, 2093-105.
- Saldanha, J., Singh, J. and Mahadevan, D.** (1998). Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci* **7**, 1632-5.

- Salic, A. N., Kroll, K. L., Evans, L. M. and Kirschner, M. W.** (1997). Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development* **124**, 4739-48.
- Sampath, K., Rubinstein, A. L., Cheng, A. M., Liang, J. O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M. E. and Wright, C. V.** (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* **395**, 185-9.
- Sanchez-Camacho, C. and Bovolenta, P.** (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* **135**, 3531-41.
- Sanchez-Camacho, C., Rodriguez, J., Ruiz, J. M., Trousse, F. and Bovolenta, P.** (2005). Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 242-52.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E., Sullivan, M. J., Dobyms, W. B. and Eccles, M. R.** (1995). Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* **9**, 358-64.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S. and Shimono, A.** (2006). Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* **133**, 989-99.
- Satoh, W., Matsuyama, M., Takemura, H., Aizawa, S. and Shimono, A.** (2008). Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* **46**, 92-103.
- Sauer, F. C.** (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neur.* **62**, 377-405.
- Sauer, F. C.** (1936). The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei. *Journal of Morphology* **60**, 1-11.
- Schmitt, A. M., Shi, J., Wolf, A. M., Lu, C. C., King, L. A. and Zou, Y.** (2006). Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* **439**, 31-7.
- Schweizer, L. and Varmus, H.** (2003). Wnt/Wingless signaling through beta-catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol* **4**, 4.
- Shi, D. L., Goisset, C. and Boucaut, J. C.** (1998). Expression of Xfz3, a *Xenopus* frizzled family member, is restricted to the early nervous system. *Mech Dev* **70**, 35-47.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. and Furutani-Seiki, M.** (2000). Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* **98**, 3-17.
- Shkumatava, A., Fischer, S., Muller, F., Strahle, U. and Neumann, C. J.** (2004). Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* **131**, 3849-58.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. and Boncinelli, E.** (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, 687-90.
- Slusarski, D. C. and Pelegri, F.** (2007). Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol* **307**, 1-13.

- Smith, J. C. and Gurdon, J. B.** (2004). Many ways to make a gradient. *Bioessays* **26**, 705-6.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1991). Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* **67**, 753-65.
- Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. and Melton, D. A.** (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* **67**, 741-52.
- Song, L. and Fricker, L. D.** (1997). Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallocarboxypeptidase. *J Biol Chem* **272**, 10543-50.
- Stenkamp, D. L.** (2007). Neurogenesis in the fish retina. *Int Rev Cytol* **259**, 173-224.
- Stern, C. D.** (2006). Neural induction: 10 years on since the 'default model'. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 692-7.
- Tabata, T. and Takei, Y.** (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.
- Tada, M., Concha, M. L. and Heisenberg, C. P.** (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 251-60.
- Tahayato, A., Sonnevile, R., Pichaud, F., Wernet, M. F., Papatsenko, D., Beaufils, P., Cook, T. and Desplan, C.** (2003). Otd/Crx, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the *Drosophila* retina. *Dev Cell* **5**, 391-402.
- Tahinci, E., Thorne, C. A., Franklin, J. L., Salic, A., Christian, K. M., Lee, L. A., Coffey, R. J. and Lee, E.** (2007). Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* **134**, 4095-106.
- Take-uchi, M., Clarke, J. D. and Wilson, S. W.** (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development* **130**, 955-68.
- Tan, C., Deardorff, M. A., Saint-Jeannet, J. P., Yang, J., Arzoumanian, A. and Klein, P. S.** (2001). Kermit, a frizzled interacting protein, regulates frizzled 3 signaling in neural crest development. *Development* **128**, 3665-74.
- Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X. and Heasman, J.** (2005). Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **120**, 857-71.
- Tendeng, C. and Houart, C.** (2006a). Cloning and embryonic expression of five distinct sfrp genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns* **6**, 761-71.
- Tendeng, C. and Houart, C.** (2006b). Cloning and embryonic expression of five distinct sfrp genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns*.
- Thompson, H., Barker, D., Camand, O. and Erskine, L.** (2006a). Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Dev Biol* **296**, 476-84.
- Thompson, H., Camand, O., Barker, D. and Erskine, L.** (2006b). Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *J Neurosci* **26**, 8082-91.

- Trousse, F., Esteve, P. and Bovolenta, P.** (2001a). Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* **21**, 1292-301.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M. and Bovolenta, P.** (2001b). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* **128**, 3927-36.
- Ulrich, F., Krieg, M., Schotz, E. M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P. H. and Heisenberg, C. P.** (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev Cell* **9**, 555-64.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S. and Rubin, J. S.** (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* **275**, 4374-82.
- Van Raay, T. J., Moore, K. B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W. A. and Vetter, M. L.** (2005). Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* **46**, 23-36.
- Veien, E. S., Rosenthal, J. S., Kruse-Bend, R. C., Chien, C. B. and Dorsky, R. I.** (2008). Canonical Wnt signaling is required for the maintenance of dorsal retinal identity. *Development*.
- Vogel-Hopker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L. and Rapaport, D. H.** (2000). Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech Dev* **94**, 25-36.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-49.
- Wang, H. Y., Liu, T. and Malbon, C. C.** (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* **18**, 934-41.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P. and Moos, M., Jr.** (1997a). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-66.
- Wang, S., Krinks, M. and Moos, M., Jr.** (1997b). Frzb-1, an antagonist of Wnt-1 and Wnt-8, does not block signaling by Wnts -3A, -5A, or -11. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 502-4.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J. and Wallace, V. A.** (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* **132**, 5103-13.
- Warburg, M.** (1993). Classification of microphthalmos and coloboma. *J Med Genet* **30**, 664-9.
- Weston, C. R., Wong, A., Hall, J. P., Goad, M. E., Flavell, R. A. and Davis, R. J.** (2003). JNK initiates a cytokine cascade that causes Pax2 expression and closure of the optic fissure. *Genes Dev* **17**, 1271-80.
- Whitaker, S. L. and Knox, B. E.** (2004). Conserved transcriptional activators of the *Xenopus* rhodopsin gene. *J Biol Chem* **279**, 49010-8.
- Wilson, S. W. and Houart, C.** (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* **6**, 167-81.

- Xu, Y. K. and Nusse, R.** (1998). The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* **8**, R405-6.
- Yabe, T., Shimizu, T., Muraoka, O., Bae, Y. K., Hirata, T., Nojima, H., Kawakami, A., Hirano, T. and Hibi, M.** (2003). Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling. *Development* **130**, 2705-16.
- Yan, R. T., Ma, W., Liang, L. and Wang, S. Z.** (2005). bHLH genes and retinal cell fate specification. *Mol Neurobiol* **32**, 157-71.
- Yoshino, K., Rubin, J. S., Higinbotham, K. G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S. Y. and Perantoni, A. O.** (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mech Dev* **102**, 45-55.
- Yost, C., Farr, G. H., 3rd, Pierce, S. B., Ferkey, D. M., Chen, M. M. and Kimelman, D.** (1998). GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* **93**, 1031-41.
- Zhao, S., Hung, F. C., Colvin, J. S., White, A., Dai, W., Lovicu, F. J., Ornitz, D. M. and Overbeek, P. A.** (2001). Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation. *Development* **128**, 5051-60.
- Zhong, X., Desilva, T., Lin, L., Bodine, P., Bhat, R. A., Presman, E., Pocas, J., Stahl, M. and Kriz, R.** (2007). Regulation of secreted Frizzled-related protein-1 by heparin. *J Biol Chem* **282**, 20523-33.
- Zou, Y. and Lyuksyutova, A. I.** (2007). Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 22-8.
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A.** (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-67.

11.ARTÍCULOS

Nota del autor:

Las revisiones siguientes en las que el autor de este trabajo ha participado, se realizaron durante el transcurso del periodo de Tesis Doctoral. Éstas tratan de recabar y mostrar las diferentes funciones y mecanismos de actuación de los miembros de la familia de los SFRP durante el desarrollo embrionario (actuando, por ejemplo, como moléculas de guía axonal) o en diferentes enfermedades. Por ello, y como posible nexo con la función descrita de la función de SFRP5, se ha considerado relevante incluirlas en este trabajo.

Available online at www.sciencedirect.com

Brain Research Reviews 49 (2005) 242–252

**BRAIN
RESEARCH
REVIEWS**
www.elsevier.com/locate/brainresrev

Review

Morphogens as growth cone signalling molecules

Cristina Sánchez-Camacho^a, Josana Rodríguez^a, José María Ruiz^a, Françoise Trousse^b,
Paola Bovolenta^{a,*}

^a*Instituto Cajal, CSIC, Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain*^b*Centre de Biologie du Développement, CNRS/UPS UMR 5547. Univ. P. Sabatier, Toulouse Cedex 4 31062, France*

Accepted 18 October 2004

Available online 24 December 2004

Abstract

Morphogen signalling among cells is one of the most important mechanisms underlying the progressive patterning of embryos. Members of the hedgehog (Hh), wingless (Wnt), transforming growth factor- β (TGF β), and fibroblast growth factor (Fgf) families of extracellular signalling molecules act as morphogens. Recent studies have demonstrated that members of these four families of proteins, secreted by well-characterised organiser centres in the central nervous system (CNS) as floor plate or midbrain–hindbrain boundary, are reused at later developmental stages to control axon growth. Here, we have summarised the evidence for this novel idea with a particular emphasis on those related to Shh and Wnt signalling—the object of some works in our laboratory.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Development and regeneration*Topic:* Axon guidance mechanisms and pathways*Keywords:* Retina ganglion cell axon; Commissural axon; Shh; Wnt signalling; Fgf8; BMP

Contents

1. Introduction.	243
2. The “classical” axon guidance cues: an overview	243
3. BMPs.	244
4. Shh	245
5. Fgf	246
6. Wnt.	247
7. Conclusions and perspectives	250
Acknowledgments	250
References	250

Abbreviations: Calcn, Ca²⁺-sensitive protein phosphatase calcineurin; CamKII, Ca²⁺ calmodulin-sensitive protein kinase II; CNG channels, cyclic nucleotide-gated ion channels; DAG, diacylglycerol; Dvl, Dishevelled; Fz, Frizzled; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; IP₃, inositol 1,4,5 triphosphate; MAP-1B, microtubule-associated protein 1B; MTs, microtubules; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; PDE, phosphodiesterase; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; PLC, phospholipase C; TCF-LEF1, T cell transcription factor–lymphocyte enhancer factor 1; TFs, transcription factors; β cat, β -catenin

* Corresponding author. Fax: +34 91 585 4754.

E-mail address: bovolenta@cajal.csic.es (P. Bovolenta).

0165-0173/\$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainresrev.2004.10.004

1. Introduction

Tissue removal and tissue transplantation using different species of amphibian embryos have been at the basis of the embryological work of Spemann [71] and Spemann and Mangold [72], who provided the first evidence for the existence of signalling among cells. Using the abutting lens placode and optic vesicle as a model, they established that some groups of cells can send signals to the nearby tissue, upon which the receiving cells adopt a new direction of differentiation [71]. The large number of studies that followed this pioneer work has now established that signalling among cells is one of the most important mechanisms underlying the progressive patterning of an embryo, which is mediated by molecules known as “morphogens.” Rigorously speaking, morphogens are secreted proteins, produced by a restricted group of cells in a tissue that, diffusing away from their sources, induces distinct cellular responses in a concentration-dependent manner. Therefore, although in most developmental stages cells exchange signals through secreted molecules, only members of the hedgehog (Hh), wntless (Wnt), and transforming growth factor- β (TGF β) families have initially fulfilled the criteria for a morphogen [24,73]. These families of signalling molecules activate specific intracellular cascades that ultimately dictate to the cell how to behave.

As for other tissues and organs, the progressive patterning of the vertebrate central nervous system (CNS) involves these signalling cascades. Examples of this requirement include the graded function of Wnt molecules to pattern the neural plate along its antero-posterior axis [89] and the antagonistic

function of bone morphogenetic proteins (BMPs) and Sonic hedgehog (Shh) to specify neuronal identity along the dorso-ventral axis of the neural tube [35,41]. In addition, the elegant work of Martinez et al. [53], which has inspired this special issue, has allowed distinguishing, through the use of quail–chick transplants, a new signalling centre in the brain: the isthmus organiser. Molecular analysis of this organiser, positioned at the midbrain–hindbrain boundary (MHB), has later identified fibroblast growth factor-8 (Fgf8) as responsible for the organiser activity [17,33,54], thus providing the first evidence for the now-accepted idea [20,42] that Fgfs may also work as morphogens.

Although conceptually different, there might be some similarities in the way morphogen gradients instruct a neuroblast to acquire a given identity, and the mechanisms by which extracellular signalling molecules control the direction of elongation of a given axon. Thus, the recent discovery that morphogen signalling is reused at later developmental stages to control axon growth is not a total surprise. In this review, we will summarise recent work that has implicated Fgf, Bmp, Shh, and Wnt signalling as axon guidance cues. We will focus mainly on the evidence existing in vertebrates with a particular emphasis on those related to Shh and Wnt signalling—the object of some works of our laboratory.

2. The “classical” axon guidance cues: an overview

In general terms, axon guidance cues are molecules located along the trajectory of an axon that direct the

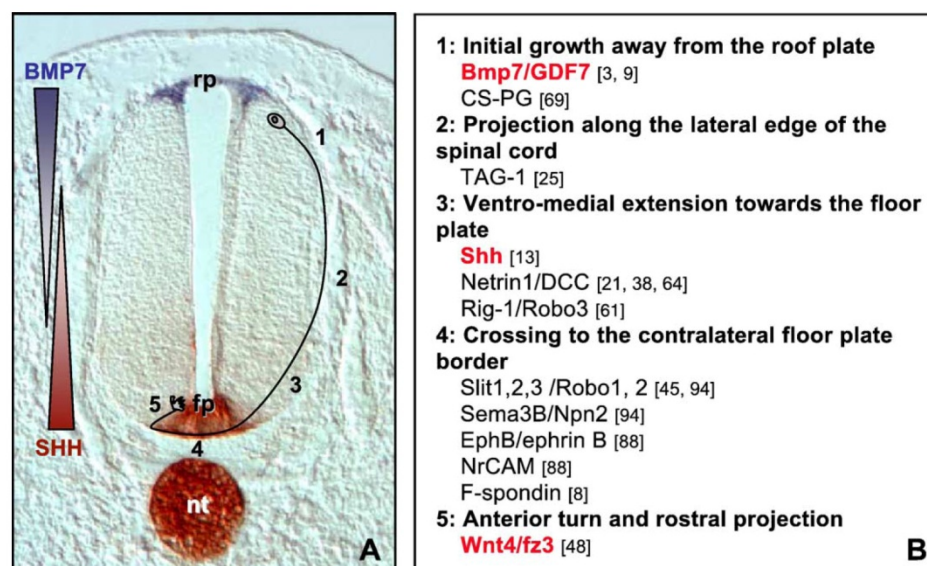


Fig. 1. Schematic diagram of guidance cues involved in the axonal projections of commissural axons in the developing vertebrate spinal cord. (A) Transverse section of the spinal cord from an HH18 chick embryo showing the immunolocalization of SHH in red and *Bmp7* transcripts in blue. The drawing represents a commissural neuron and its axonal pathway in the transversal and longitudinal plane of the spinal cord. The axonal trajectory has been divided in four segments indicated by numbers. (B) List of the known molecules that participate in the guidance of commissural axon in the four different segments of its path as indicated in (A). Respective references are indicated in square brackets. fp, floor plate; nt, notochord; rp, roof plate.

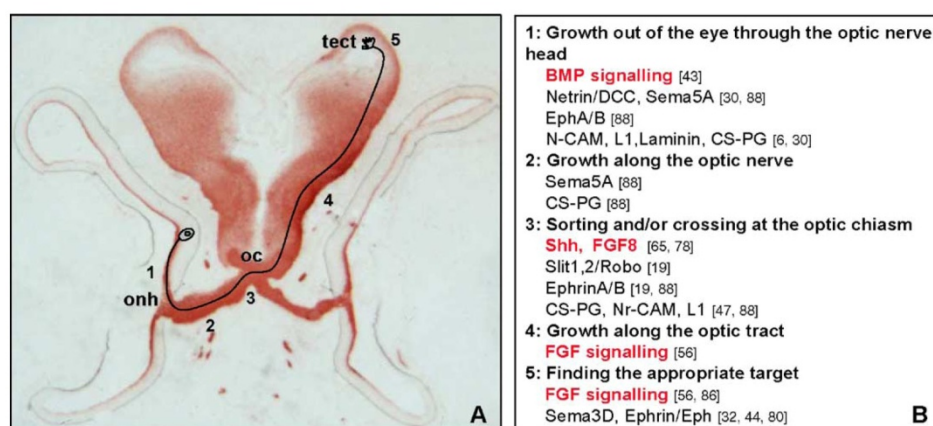


Fig. 2. Schematic diagram of guidance cues involved in the axonal projections of the vertebrate RGCs. (A) Frontal section from an HH27 chick embryo head showing the optic pathway, immunolabelled with antibodies against β III tubulin. The RGC axon pathway has been divided in five segments indicated by numbers. (B) List of the known molecules that participate in the guidance of visual fibres in the different segments of its path as indicated in (A). Respective references are indicated in square brackets. oc, optic chiasm; onh, optic nerve head; tect, optic tectum.

movement of its growth cone towards the appropriate synaptic partner. The nature of some of these cues, as for example the family of cell adhesion molecules (CAMs), has been known for several years [85]. However, more recently, the power of genetic analysis has led to the discovery of several conserved families of axon guidance molecules, including Ephrins, Netrins, Slits, Semaphorins, and their respective receptors Eph, DCC/Unc5, Robo, and Plexin/Neuropilin. These molecules are distributed along the path of distinct axonal populations, and most of them can function both as attractant or repellent, depending on the intracellular and extracellular context of the axonal growing tip [19]. Thus, the movement of a growth cone is dictated by its competence of interpreting and integrating the sequential or combinatorial information provided by these different ligand–receptor signalling systems. Clear intracellular mediators of these multiple signals are cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) and Ca^{2+} ions, the levels of which are modified in response to most guidance cues. Additional changes triggered by guidance cues include local protein synthesis, endocytosis, and degradation—events that may allow compartmentalised modifications in the growth cone and, thus, steering [80]. The complete molecular cascade involved in the flow of information between these steps and the final cytoskeletal reorganisation that serves as the output for growth cone motility and behaviour is still unclear, but some components are beginning to emerge [37].

Instrumental for the understanding of these general concepts and their relevance *in vivo* have been, among others, two well-characterised model systems: the visual system and the commissural neurons of the spinal cord. Commissural neurons are located in the dorsal spinal cord adjacent to the roof plate. Their axons extend away from the roof plate, taking a ventral pathway along the lateral border of the neural tube. Before reaching the developing motor neuron pool, commissural axons change direction and project

ventrally and medially towards a group of cells in the ventral midline, the floor plate. After crossing to the contralateral side, they turn sharply at right angle to follow the floor plate border in the rostral direction [5] (Figs. 1 and 3). Similar changes in trajectory are observed in the vertebrate visual system (Fig. 2), where the exit of retinal ganglion cell (RGC) axons from the eye through the optic nerve head and their crossing and possible sorting (depending on the vertebrate species) at the optic chiasm constitute two critical steps in their course towards their main synaptic target in the midbrain, optic tectum, or superior colliculus (in mammals).

Interestingly, these two systems have been also pivotal in the discovery of the axon guidance capabilities of morphogen signalling pathways.

3. BMPs

BMPs and the related growth differentiation factors (GDFs) are signalling molecules of the TGF β superfamily. Members of both families are secreted by cells of the roof plate and their graded signalling is required for the specification of the dorsal interneurons in the spinal cord, including commissural neurons [41] (Fig. 1). The first evidence that this morphogenetic gradient is, soon after, reused as a guidance cue came from studies of Augsburg et al. [3]. Juxtaposing roof plate and dorsal spinal cord explants, they showed that roof plate cells reorient commissural axon growth, an effect blocked by BMP antagonists and mimicked by BMP7-expressing cell lines. In agreement with these results, commissural axons of *Bmp7* null mice take an abnormal medial or dorsal direction towards the roof plate, crossing, in a few cases, the dorsal midline. This misrouting is only transient and normal growth is restored at later stages. Furthermore, roof plate explants from *Bmp7*^{−/−} embryos retain some ability of reorienting commissural fibres,

suggesting that additional molecules might be involved. Because BMPs can form functional homodimers and heterodimers [2,12], *Bmp6* and *Gdf7*, which are also expressed in the rodent roof plate, were both likely candidates. However, tissue recombination experiments validated only GDF7 as the possible interactor of BMP7. This interaction was confirmed in vitro and the resulting heterodimers were more effective than either BMP7 or GDF7 homodimers in deflecting commissural axon growth. The mechanism of action of BMP7 and GDF7 as heterodimers was also supported by the analysis of mutant mice. Thus, commissural axons of *Gdf7*^{-/-} embryos grew with defects comparable to those observed in *Bmp7*^{-/-} mice. This phenotype was not exacerbated in embryos with a compound mutation (*Bmp7*^{-/-}; *Gdf7*^{-/-}), indicating that the absence of either of the two molecules was sufficient to generate the full axon guidance phenotype [9]. These defects were not secondary to an alteration in commissural neuron specification since in both single and double mutants, these neurons were specified in a normal position. Moreover, dorsal spinal cord explants derived from these embryos were sensible to the activity of wild-type roof plate, indicating that commissural neurons of *Bmp7*^{-/-} and/or *Gdf7*^{-/-} mice retained properties of their wild-type counterparts.

Together, these data support the conclusion that BMP7:GDF7 heterodimers are required as growth cone guidance cues for commissural axons independently of the morphogenetic activity of members of the TGF β family on dorsal spinal cord neurons (Fig. 1). Although this is the only clear demonstration that BMPs secreted by the same cellular source act in both cell specification and axon guidance, additional evidence implicates BMP signalling in axon growth.

BMPs function by binding to a receptor complex made of a type I and a type II receptor, where type I molecules are responsible for signal transduction. One of these receptors, *Bmpr1b*, is expressed, within the embryonic mouse eye, exclusively in the ventral retina. Targeted deletion of this gene results in misrouting of ventral RGC axons that fail to enter the optic nerve head, turning away from it [43]. It is not clear whether this defect reflects a normal requirement for a BMP signal in ventral RGC axon guidance, or whether the defect is secondary to the BMP-dependent dorso-ventral patterning of the eye [14], a possibility not fully addressed in the analysis of this mutant. Nevertheless, it is worth mentioning that *Bmp4* and *Bmp7* are strongly expressed in specific regions of the eye, including the surroundings of the optic nerve head [77] and the absence of BMP7 in null mice is associated with the failure of RGC axons to leave the eye (Julian Morcillo and P.B., unpublished observations).

4. Shh

Counterbalancing the dorsalising activity of roof plate-derived BMP, Sonic hedgehog (Shh), secreted by the floor

plate, is necessary to establish the identity of ventral neurons possibly along the entire A–P axis [35]. This morphogen, a member of the hedgehog family, has additional patterning activity in the CNS and, during eye formation, is required for proximo-distal and dorso-ventral patterning of the optic vesicle [52]. In addition, it has been proposed that Shh, initially expressed along the axial midline of the entire embryo, might specify cells of the chiasm midline, a group of neurons and glial cells fundamental for the correct navigation of RGC axons [55]. Detailed analysis of *Shh* distribution in the preoptic/chiasmatic region provided the initial hint for a series of experiments, which led to the novel idea that Shh controls growth cone movements [78]. Thus, the initial expression of Shh along the entire axial midline of the chick embryo undergoes a specific spatio-temporal restricted downregulation at the chiasm level, associated with the arrival of RGC axons in this region, suggesting that *Shh* repression at the midline might be important to establish the correct navigation of the visual axons [78] (Fig. 2). This interpretation was supported by the phenotype of *Pax2* null mice and the equivalent *noi* zebrafish mutant, where aberrant projections of the RGC axons were associated to morphological alterations and persistent expression of *Shh* in the optic recess [49,75]. To test this hypothesis, we showed that Shh-soaked beads reduced the normal outgrowth from chick retina explants grown in collagen gel matrices, without modification of the proliferation or differentiation rate of the retina explants [78]. This response is the result of Shh direct action on the RGC growth cones that respond with a reversible and reinducible collapse upon repeated Shh applications. Consistent with these observations, retroviral-mediated ectopic expression of *Shh* in the optic recess area clearly impaired the normal growth of the retinal fibres, without affecting patterning and neuronal differentiation in the eye.

The Shh morphogenetic signalling is initiated by its binding to Patched, an 11-pass transmembrane receptor that, under basal conditions, sequesters the activity of Smoothened (Smo), a G-protein-associated receptor-like protein. In response to Shh binding, Ptc releases Smo, which activates a G α i subunit to inhibit cAMP production within the cell. Transcription of *Shh* downstream targets further requires the activity of the *Gli* family of zinc finger transcription factors, which are in turn negatively regulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase [52]. Although it has been impossible to determine if *Ptc* proteins are localised on the growth cone, chick RGCs express *Ptc1* and *Ptc2* (F.T. and P.B., unpublished observations) and respond to Shh signalling by lowering the intracellular concentration of cAMP [78], a mechanism that underlies the repellent activity of several growth cone guidance cues [70]. Thus, local and fast changes within the growth cone seem responsible for the chemosuppressor activity of Shh, although Gli-mediated transcriptional regulation has not been so far excluded. In this respect, it is interesting to note that the zebrafish *smu* mutant that carries a mutation in the

smoothed receptor lacks the postoptic and anterior commissures and the optic chiasm [82], although it is still unclear whether this defect is a direct consequence of *smo* function on RGC axons.

The physiological significance of these observations, in vivo, might be related to the restriction of *Shh* expression at the chiasm border, which might be necessary to specify a constrained pathway within the ventral midline, which funnels RGC axons to the contralateral side of the brain [78] (Fig. 2). If this is the case, then an obvious question arises: What happens in the mouse where the chiasm midline is a choice point for ipsilateral and contralateral projecting fibres?

In the mouse, ipsilateral projecting axons originate from RGCs of the ventro-temporal retina. A recent study has shown that *Zic2*, a transcription factor of the zinc finger family with a specific spatio-temporal restricted expression in ventro-temporal retina, is required for the divergence of ipsilateral fibres at the optic chiasm [29]. In addition, a graded expression of the related *Zic3* in the retina is important for the initial growth of RGC axons towards the optic disc [93]. *Shh* and *Zic* genes may control similar processes. Indeed, mutations in both *ZIC2* and *Shh* are a cause of holoprosencephaly in humans [84] and *Zic2* expression is absent in the optic vesicles of *Shh* null mice [7]. *Shh*, which is known to regulate the expression of its own receptor *Ptc* [50], is also expressed in RGCs [58,83]. If a regulatory loop between *Zic2* and *Shh* exists, this could be involved in controlling the expression of receptors for guidance cues in ventral RGCs. Furthermore, although *Zic2* seems to act primarily in the retina, it is also expressed in the optic chiasm [7,29], where it could regulate the expression of guidance cues, including *Shh*. In this context, our preliminary results suggest a differential action of *Shh* on ipsilateral and contralateral projections of the mouse visual system.

There are increasing evidence that axon guidance cues contribute also to establish the routes of migration of glial and neuronal precursors [51,79]. With an interesting parallel, *Shh* does also inhibit the migration of neural crest cells with a mechanism that possibly involves integrin function [74]. *Shh*, however, does not always provide a stop sign for movement, as its function as an attractive cue has been demonstrated for its homologue *hh* in *Drosophila* germ cell migration [18] and, more recently, for vertebrate commissural axon turning [13].

The ventro-medial growth of commissural axons towards the floor plate is, in part, mediated by the *Netrin1*/DCC signalling system (Fig. 1). *Netrin1*, a long-range chemo-attractant molecule, is secreted by floor plate cells [38], while commissural growth cones express its receptor DCC. In mice deficient in either of the two proteins, many commissural axons fail to enter the ventral spinal cord [21,64]. However, some of the fibres reach and cross the midline, suggesting that other attractive signals derived from the floor plate might contribute to their behaviour. The idea

that *Shh* could be a likely candidate for this function came from the analysis of mice deficient in *Gli2*, one of the effectors of *Shh* signalling [13]. The spinal cord of *Gli2*^{-/-} embryos lacks a floor plate but is otherwise normally patterned, presenting also some expression of *Netrin1* in the ventral spinal cord. In spite of the presence of this cue, ventral projections of commissural axons are highly disorganised. Defects observed in *Netrin1*^{-/-} and *Gli2*^{-/-} embryos are exacerbated in the double mutants, where commissural axons rarely invade the ventral half of the spinal cord. Consistent with this observation, *Shh*-expressing cells, although unable to promote neurite outgrowth from dorsal spinal cord explants, induced turning of commissural fibres, an effect blocked by cyclopamine, an inhibitor of the *Shh* receptor *Smo*. A similar attractive activity was observed in isolated *Xenopus* spinal cord neurons exposed to a localised *Shh* gradient. Although these experiments gave a clear indication that *Shh* was acting directly on the commissural growth cone through the activation of *Smo*, an indirect effect through a morphogenetic repatterning activity could not be excluded. However, analysis of the expression of different dorso-ventral markers ruled out this possibility, demonstrating that *Shh* did not change the identity of spinal cord explants used in the assays. The definitive proof that *Shh* is necessary to direct the turning of commissural growth cones at the ipsilateral edge of the floor plate was provided by the generation of a mouse conditional mutant. Taking advantage of the restricted expression of *Wnt1* in the dorsal portion of the spinal cord, Charron et al. [13] selectively inactivated *Smo* in commissural neurons using the *Cre/loxP* recombinase system driven by the *Wnt1* promoter. In the resulting mice, *Smo*-deficient commissural axons grew towards the floor plate in a defasciculated manner, invading the motor columns. Taken together, these results demonstrate that *Shh* activity signalling through *Smo* helps to drive commissural axons through the floor plate ventral midline [13] (Fig. 1).

5. Fgf

Fgfs are a large family of secreted factors composed of at least 23 members, some of which exist in different isoforms [60]. This family of signalling molecules is used in many different tissues to control proliferation and differentiation [91]. At least one of its members, *Fgf8*, has a clear morphogenetic activity during embryonic development [20,42], contributing to the inductive properties of the isthmic organiser at the MHB [33,54]. Trochlear motor neurons, which innervate the muscles of the eye, are specified within the isthmic tissue [34]. Their axons, particularly those arising from the most posterior neurons, project towards and extend within the *Fgf8*-expressing isthmic region. A series of in vitro and in vivo experiments using the chick as a model system demonstrates that *Fgf8*

derived from the isthmus does normally contribute to the guidance of trochlear axons out of the neural tube [34]. Thus, Fgf8, released from beads, attracts trochlear axons in vitro and redirects their growth towards the beads in vivo. Furthermore, the normal trajectory and fasciculation of the trochlear axons are perturbed by an antiserum directed against Fgf8 or by pharmacological blockade of Fgf receptors, demonstrating that the positive activity of Fgf signalling contributes, together with repellent cues provided by members of the Netrin and Sema families [16,81], to the formation of the IV cranial nerve [34].

The data described above are possibly the best evidence for an Fgf-mediated patterning activity, which is later converted into an axon guidance cue. However, there are other examples for the in vivo requirement of Fgf signalling as a modulator of growth cone progression. In *Xenopus* embryos, Fgf receptors are expressed in the RGC axons. Inhibition of FgfR activity by lipofection of a dominant negative form of these receptors slows the growth of the axons and interferes with their target recognition [56] (Fig. 2). Similar elongation defects or aberrant navigation of the axons are observed in the *Xenopus* optic tract or in the mouse optic chiasm of embryos where the synthesis of heparan sulphate proteoglycans, required for Fgf, Hh, and Wnt signalling [63], is altered [32,86]. Furthermore, in the zebrafish *ace* mutants, which encode a truncated Fgf8 protein, RGC axons are misrouted at the chiasm, forming an ectopic ipsilateral projection. These defects can be explained by a Fgf8 requirement at the optic chiasm, since the eyes of *ace* mutants are normally patterned and, when transplanted in wild-type embryos, do originate correct projections [65] (Fig. 2). Because alterations in both *Fgf8* and *Shh* expression at the chiasm are associated with a similar RGC axonal phenotype, it will be interesting to analyse whether and how these two pathways coordinate their activity as guidance cues, especially because their interplay during eye formation has been already reported [10].

6. Wnt

Wnts are secreted glycoproteins involved in tissue patterning as well as in the regulation of cell proliferation and differentiation in several tissues, including the nervous system. Wnts activate at least two different signalling pathways by binding to Frizzled (Fz) receptors belonging to the superfamily of G-protein couple receptors (GPCR) [31,57]. Components of these pathways participate in both gene transcription and cell adhesion [57]. A central step in the activation of canonical Wnt signalling is the inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), a serine/threonine kinase with multiple substrates, including β -catenin and microtubule-associated proteins (MAPs).

Inhibition of GSK3 β decreases phosphorylation of MAPs, which in turn alters microtubule organisation, thus

originating changes in cell shape. This link between Wnt signalling and cytoskeletal organisation has been a central point to explaining the initial observations involving Wnts in brain wiring. Indeed, target-derived Wnt7a and Wnt3 are required for growth cone remodelling and synapse formation in the cerebellum and spinal cord, respectively [27,39]. Both molecules inhibit GSK3 β ; this decreases the phosphorylation of MAP1B, generating the unbundling of the microtubules and spreading of axon terminals (Fig. 4A). In addition, clustering of synapsin I, a prerequisite for synaptogenesis, is also observed. In agreement with this observation, there is a clear delay in glomerular rosettes (formed by the synapses between a mossy fibre terminal and the dendrites of multiple granule cells) maturation in the cerebellum of early postnatal Wnt7a knockout mice [27]. Although this work clearly demonstrates that Wnts signal at the axonal terminal, it does not indicate if these molecules are required for axon guidance. The first clear demonstration of this activity came from the invertebrate field.

The *Drosophila* central nerve cord, a structure that can be compared to vertebrate spinal cord, is composed by a large number of commissural axons. As their vertebrate counterparts, these axons are attracted towards the midline by diffusible cues like Netrin, and their decision of whether to cross or not to cross is then mediated by the midline Slit/Robo signalling system [19]. In each segment of the cord, commissural axons can cross following either the anterior commissural (AC) or posterior commissural (PC) tract (Fig. 3A). Recent work from Williams et al. [88] shows that Wnt5, strongly expressed in a subset of cells ventral to the PC, is crucial for this decision (Fig. 3A). Previous studies had already shown that ectopic expression of *wnt5* (previously known as DWnt-3) specifically disrupted commissural axon tract formation [23]. In *wnt5* *Drosophila* mutants, AC axons abnormally cross the midline through the PC [92], a phenotype also observed in mutants of *Derailed* (*Drl*), an atypical receptor tyrosine kinase (RYK) found on the growth cones and axons of all the neurons that project through the AC [4]. Because there was an epigenetic interaction between *Drl* and Wnt5 mutants, Yoshikawa et al. [92] tested a possible functional interaction between the two molecules. Misexpression of *Drl* in PC neurons caused the misrouting of their axons through the AC, a result not observed in a *wnt5* homozygous mutant background. Complementing this observation, Wnt5 misexpression at the midline caused a reduction of AC, a phenotype not observed on a *Drl* mutant background. These phenotypes were not associated to alterations in the specification of the cell fate in the nerve cord, providing clear evidence for a direct role of Wnt5 as a repellent axon guidance cue for anterior commissural axons. As a particularly novel aspect, this function of Wnt5 is mediated by its binding to *Derailed*, an unexpected receptor for Wnt [92].

The evidence that Wnts signal also at the vertebrate growth cone came from the analysis of a related question:

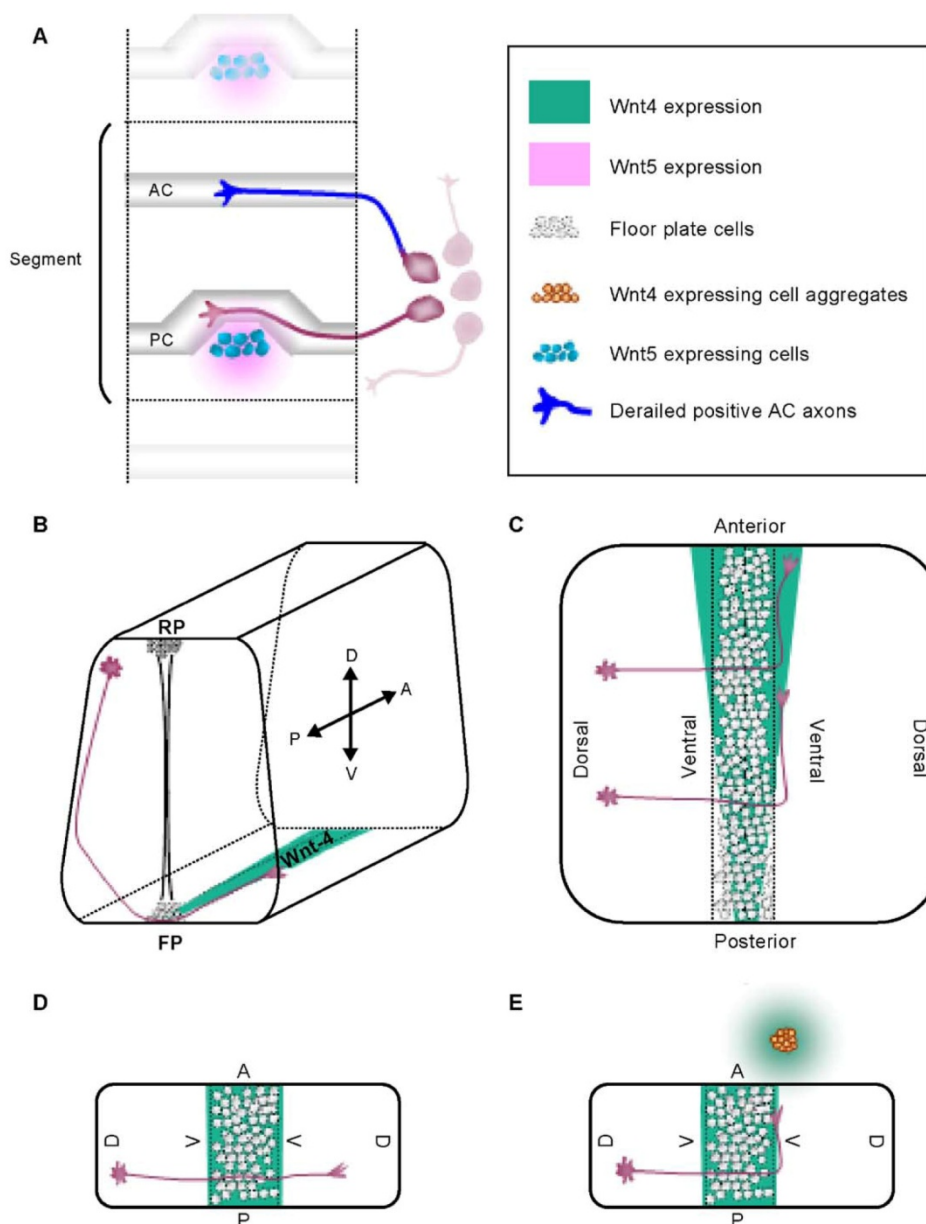


Fig. 3. Schematic representation of the experimental systems used to demonstrate the in vivo implication of Wnts in axon guidance. (A) In *Drosophila melanogaster*, Wnt5 expressed ventrally to the PC acts as a repellent guidance cue, preventing Drl-positive AC axons from crossing the midline at the PC [92]. (B) Three-dimensional drawing and (C) open book configuration of the vertebrate spinal cord where the graded distribution of Wnt4, guiding commissural axons in the rostral direction [48], is depicted in green. (C) This gradient is suppressed in short explants, thus inhibiting the anterior turn [48]. (D) Attraction effect is rescued by cell aggregates expressing Wnt4 placed anterior to the explants [48]. (E) Posterior commissural axons are represented in red. A, anterior; AC, anterior commissural tract; D, dorsal; FP, floor plate; P, posterior; PC, posterior commissural tract; RP, roof plate; V, ventral.

What causes the rostral growth of spinal cord commissural axons once they have crossed the midline? Using open book preparations of the embryonic rat spinal cord, Lyuksyutova et al. [48] demonstrated that this growth requires a gradient of a diffusible molecule, since disrupt-

ing the gradient by shortening the explants in the A–P perturbed the rostral turning of the axons (Fig. 3B–D). Of the several diffusible molecules tested, only Wnt4 seemed to be expressed as expected for such a function and, when applied to “short explants,” was capable of rescuing the

anterior turn of commissural axons (Fig. 3E). In contrast, application of secreted frizzled related proteins (SFRPs), extracellular antagonists of Wnt activity, interfered with the normal anterior growth of intact explants. Furthermore, Wnt4-expressing cell lines placed caudally to the axon turning point induced an abnormal caudal turn. Altogether, these data demonstrated that Wnt4 is an instructive guidance cue necessary for the anterior growth of commissural axons (Figs. 1 and 3). Interestingly, post-crossing commissural axons of Fz3 null mouse embryos project randomly along the A–P axis, while maintaining a normal projection towards the floor plate, suggesting, although not proving, that Wnt4 activity might be mediated by Fz3 receptor [48].

In conclusion, in both fly and rodent, the growth of commissural axons involves Wnt signalling, but with a

rather different mechanism of action. In *Drosophila*, Wnt5 functions as a chemorepellent through an unconventional Wnt receptor, Derailed. Although there is evidence for the involvement of RYK in axon guidance [26], Drl belongs to an atypical RYK family that lacks intrinsic catalytic activity. It is, thus, unclear how signalling inside the growth cone is transduced, although physical interaction with other proteins, including the Fz [46] receptors and Eph [76], is a possibility as recently proposed for the mammalian Ryk.

In vertebrates instead, Wnt4 acts, possibly through a canonical receptor, as a chemoattractant. Whether the two mechanisms are operative in both invertebrates and vertebrates or whether derailed/Ryk function as a coreceptor along with Fz in some cases [46] need to be explored. However, it has to be noted that at least in the spinal cord commissural neurons, the Derailed mouse homologue is not

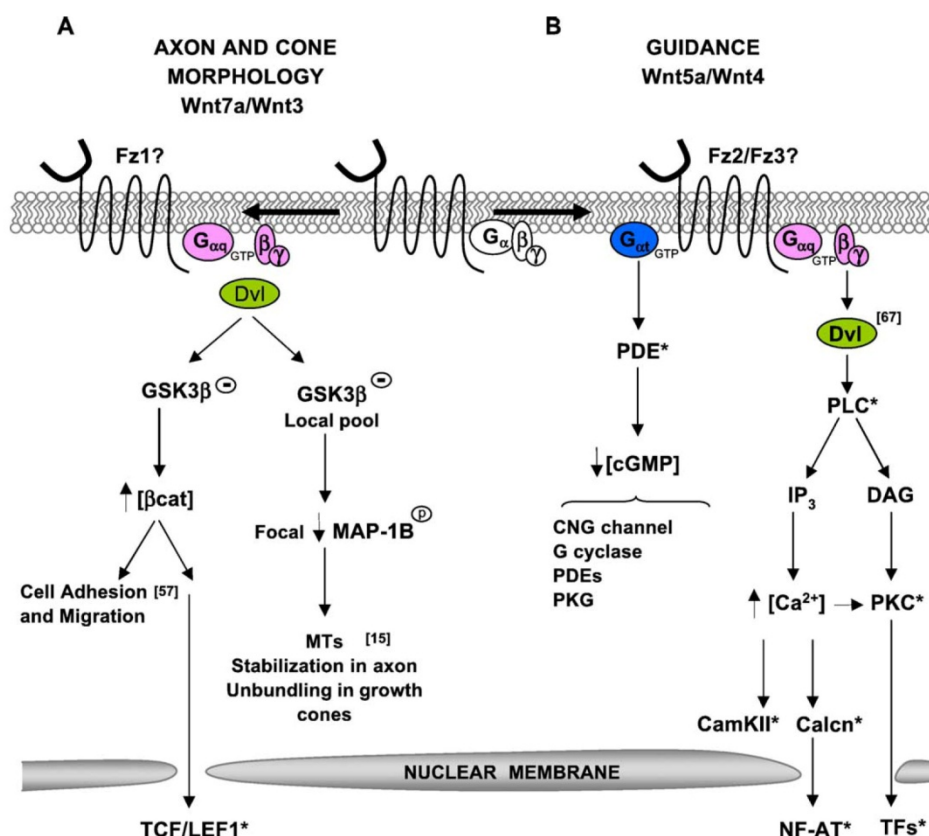


Fig. 4. Scheme of the possible Wnt signalling mechanisms involved in vertebrate axon guidance and synapse formation. (A) Activation of Wnt canonical pathway by members of class I Wnts (i.e., Wnt3, Wnt7a), possibly through Fz1, originates the accumulation of β -catenin through the inhibition of GSK3 β . This accumulation enhances its nuclear translocation, activating TCF/LEF1-mediated transcription [57]. Cytosolic increase of β -catenin might affect also cell adhesion and migration, since β -catenin links cadherin type I to the actin cytoskeleton. Inhibition of GSK3 β can trigger also an independent pathway that regulates MT stability [15]. (B) Activation of Wnt/ Ca^{2+} pathway by class II Wnt molecules (i.e., Wnt5a) through Fz2 is able to transduce two signals. The first activates PDE through G_{αt}, causing a decrease in cytosolic cGMP levels, which, in turn, originate different cellular responses. The second activates PLC causing the release of Ca^{2+} from intracellular stores (this activates CamKII and Calcn) and the activation of PKC, both affecting nuclear transcription [67]. As described in the text, Wnts from class I have been involved in growth cone remodeling and synaptogenesis. Because Wnt4, a member of the class II Wnts, regulates axon guidance, we propose that it may do so, possibly through Fz3, by activating the pathway described in (B), although cross-talk between the pathways is not excluded. *Activation; \ominus inhibition. References are indicated in brackets.

expressed [48]. Fz receptors might instead be involved in the growth of different axonal populations, since Fz3 knockout mice present severe defects in several major axon tracts within the forebrain [87]. How Fz receptors mediate axon guidance information is unclear. However, in vivo, Wnt5a–Fz2 interaction induces Ca^{2+} release from internal stores, an effect blocked by G-protein or phosphatidylinositol signalling inhibitors [68]. Ca^{2+} release, in turn, is known to activate PKC [66], calcium calmodulin-dependent protein kinase II [40], and the phosphoprotein phosphatase calcineurin [62]. Furthermore, Fz2 activation leads to a decrease of the cytosolic levels of cGMP through a specific G-protein ($\text{G}\alpha 2$)-mediated activation of the PDE phosphodiesterase, the only $\text{G}\alpha 2$ known substrate [1]. This intracellular cascade (Fig. 4B) has striking similarities with that reported for the activation of other GPCRs recently involved in axon guidance [90]. Indeed, in both rat cerebellar and *Xenopus* spinal cord neurons, ligand binding to GPCR results in an axon guidance response modulated by intracellular concentrations of cGMP. The intracellular cascade involves a Gi-GTP-mediated activation of phospholipase C (PLC). This, in turn, generates two signals: the activation of protein kinase C (PKC) and the generation of inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3), leading to release of calcium from internal stores [90]. Thus, with these similarities between the Fz2 and GPCR cascades, it would not be hard to conceive that a Fz-mediated signalling pathway could lead to a growth cone response (Fig. 4B).

These initial studies are possibly the beginning of the story of Wnt signalling in axon guidance. Given the involvement of Wnt signalling in neuronal migration [11,36], the similarities between the molecular mechanisms underlying cell migration and axon guidance and the complexity of Wnt signalling regulation, it is expected that new components of the Wnt signalling pathway will come into the axon guidance scene. In this respect, initial evidence from our laboratory indicates a prominent role for SFRPs in RGC axon elongation and guidance.

7. Conclusions and perspectives

The field of axon guidance has progressed enormously in the last two decades. The finding that morphogenetic signalling is reused in the control of growth cone movement is an additional step towards the definition of the molecular mechanisms that regulate growth cone progression in different systems. As it happens with new findings, there are now more open questions than real answers. For example, how many axonal populations are sensitive to morphogens as guidance cues? Are axons sensitive to a concentration gradient; in other words, does a growth cone respond differently to distinct morphogen concentrations? Can a growth cone sense a morphogen at a distance? If it is so, is this response important for pathfinding? The conceptual and historical relevance of these questions is

obvious. Upon his discovery of the growth cone, Ramon y Cajal [59] proposed that growth cones may select their direction of growth in response to a graded distribution of soluble molecules emanating from the distance by their targets. More than a hundred years after, there are compelling evidence that molecular gradients are important locally for the establishment of retino-tectal topographic mapping [28], but there is no clear evidence for an in vivo “long distance” guidance even in the case of molecules such as netrins or semaphorins, possibly among the best-characterised soluble guidance cues.

Other important questions are related to the mechanisms that allow the same molecule to elicit different responses. Specifically, are there real differences in the intracellular response generated by Shh, Wnt, Fgf, or Bmp when acting as morphogens or as guidance cues? How does a neuron distinguish this difference? The scarce information on the last important questions points to the idea that all these signalling molecules might induce local modifications inside the growth cone. Thus, Shh changes the level of cAMP [78], Wnt controls microtubule assembly [27,39], and there is evidence that a BMP family member, BMP4, may mediate cytoskeletal changes, which involve phosphorylation of the actin-depolymerising factor Cofilin, a regulator of actin dynamics [22]. This, however, does not exclude that transcription of target genes might be also involved, as possibly suggested by the axonal defects observed in mouse and fish mutants for the Gli proteins [13,82], the transcriptional effectors of Shh signalling.

Acknowledgments

Work in the laboratory is supported by the Spanish MCyT, the European Community, the HFSP, and the Comunidad Autónoma de Madrid. The predoctoral work of J.R. is supported by a fellowship from the CSIC-Glaxo-Wellcome.

References

- [1] A. Ahumada, D.C. Shusarski, X. Liu, R.T. Moon, C.C. Malbon, H.Y. Wang, Signalling of rat frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP, *Science* 298 (2002) 2006–2010.
- [2] A. Aono, M. Hazama, K. Notoya, S. Taketomi, H. Yamasaki, R. Tsukuda, S. Sasaki, Y. Fujisawa, Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1995) 670–677.
- [3] A. Augsburger, A. Schuchardt, S. Hoskins, J. Dodd, S. Butler, BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons, *Neuron* 24 (1999) 127–141.
- [4] J.L. Bonkowski, S. Yoshikawa, D.D. O'Keefe, A.L. Scully, J.B. Thomas, Axon routing across the midline controlled by the *Drosophila* derailed receptor, *Nature* 402 (1999) 540–544.
- [5] P. Bovolenta, J. Dodd, Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embryonic rat spinal cord, *Development* 109 (1990) 435–447.

- [6] P.A. Brittis, V. Lemmon, U. Rutishauser, J. Silver, Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina, *Mol. Cell. Neurosci.* 6 (1995) 433–449.
- [7] L.Y. Brown, A.H. Kottmann, S. Brown, Immunolocalization of *Zic2* expression in the developing mouse forebrain, *Gene Expr. Patterns* 3 (2003) 361–367.
- [8] T. Burstyn-Cohen, V. Tzarfaty, A. Frumkin, Y. Feinstein, E. Stoeckli, A. Klar, F-Spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the floor plate, *Neuron* 23 (1999) 233–246.
- [9] S.J. Butler, J. Dodd, A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons, *Neuron* 38 (2003) 389–401.
- [10] M. Carl, J. Wittbrodt, Graded interference with FGF signalling reveals its dorsoventral asymmetry at the mid-hindbrain boundary, *Development* 126 (1999) 5659–5667.
- [11] F. Carreira-Barbosa, M.L. Concha, M. Takeuchi, N. Ueno, S.W. Wilson, M. Tada, Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish, *Development* 130 (2003) 4037–4046.
- [12] C. Chang, A. Hemmati-Brivanlou, *Xenopus* GDF6, a new antagonist of noggin and a partner of BMPs, *Development* 126 (1999) 3347–3357.
- [13] F. Charron, E. Stein, J. Jeong, A.P. McMahon, M. Tessier-Lavigne, The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance, *Cell* 113 (2003) 11–23.
- [14] R.L. Chow, R.A. Lang, Early eye development in vertebrates, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 255–296.
- [15] L. Ciani, O. Krylova, M.J. Smalley, T.C. Dale, P.C. Salinas, A divergent canonical WNT-signalling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 243–253.
- [16] S.A. Colamarino, M. Tessier-Lavigne, The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons, *Cell* 81 (1995) 621–629.
- [17] P.H. Crossley, S. Martinez, G.R. Martin, Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo, *Nature* 380 (1996) 66–68.
- [18] G. Deshpande, L. Swannhart, P. Chiang, P. Schedl, Hedgehog signaling in germ cell migration, *Cell* 106 (2001) 759–769.
- [19] B.J. Dickson, Molecular mechanisms of axon guidance, *Science* 298 (2002) 1959–1964.
- [20] J. Dubrulle, O. Pourquie, Fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo, *Nature* 427 (2004) 419–422.
- [21] A. Fazeli, S.L. Dickinson, M.L. Hermiston, R.V. Tighe, R.G. Steen, C.G. Small, E.T. Stoeckli, K. Keino-Masu, M. Masu, H. Rayburn, J. Simons, R.T. Bronson, J.I. Gordon, M. Tessier-Lavigne, R.A. Weinberg, Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene, *Nature* 386 (1997) 796–804.
- [22] V.C. Foletta, M.A. Lim, J. Soosairajah, A.P. Kelly, E.G. Stanley, M. Shannon, W. He, S. Das, J. Massague, O. Bernard, J. Soosairajah, Direct signalling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 1089–1098.
- [23] L.G. Fradkin, J.N. Noordermeer, R. Nusse, The *Drosophila* Wnt protein DWnt-3 is a secreted glycoprotein localized on the axon tracts of the embryonic CNS, *Dev. Biol.* 168 (1995) 202–213.
- [24] M. Freeman, J.B. Gurdon, Regulatory principles of developmental signalling, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18 (2002) 515–539.
- [25] A.J. Furlley, S.B. Morton, D. Manalo, D. Karagogeos, J. Dodd, T.M. Jessell, The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity, *Cell* 61 (1990) 157–170.
- [26] K.L. Guan, Y. Rao, Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues, *Nat. Rev., Neurosci.* 4 (2003) 941–956.
- [27] A.C. Hall, F.R. Lucas, P.C. Salinas, Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signalling, *Cell* 10 (2000) 525–535.
- [28] M.J. Hansen, G.E. Dallal, J.G. Flanagan, Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition, *Neuron* 42 (2004) 717–730.
- [29] E. Herrera, L. Brown, J. Aruga, R.A. Rachel, G. Dolen, K. Mikoshiba, S. Brown, C.A. Mason, *Zic2* patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection, *Cell* 114 (2003) 545–557.
- [30] V.H. Hopker, D. Shewan, M. Tessier-Lavigne, M. Poo, C.E. Holt, Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1, *Nature* 401 (1999) 69–73.
- [31] J. Huelsken, W. Birchmeier, New aspects of Wnt signalling pathways in higher vertebrates, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 547–553.
- [32] M. Inatani, F. Irie, A.S. Plump, M. Tessier-Lavigne, Y. Yamaguchi, Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulphate, *Science* 302 (2003) 1044–1046.
- [33] C. Irving, I. Mason, Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of *hox* gene expression, *Development* 127 (2000) 177–186.
- [34] C. Irving, A. Malhas, S. Guthrie, I. Mason, Establishing the trochlear motor axon trajectory: role of the isthmus organizer and Fgf8, *Development* 129 (2002) 5389–5398.
- [35] T.M. Jessell, Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes, *Nat. Rev., Genet.* 1 (2000) 20–29.
- [36] J.R. Jessen, J. Topczewski, S. Bingham, D.S. Sepich, F. Marlow, A. Chandrasekhar, L. Solnica-Krezel, Zebrafish trilobite identifies new roles for strabismus in gastrulation and neuronal movements, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 610–615.
- [37] K. Kalil, E.W. Dent, Hot +tips; guidance cues signal directly to microtubules, *Neuron* 42 (2004) 877–879.
- [38] T.E. Kennedy, T. Serafini, J.R. de la Torre, M. Tessier-Lavigne, Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord, *Cell* 78 (1994) 425–435.
- [39] O. Krylova, J. Herreros, K.E. Cleverley, E. Ehler, J.P. Henriquez, S.M. Hughes, P.C. Salinas, WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons, *Neuron* 35 (2002) 1043–1056.
- [40] M. Kuhl, L.C. Sheldahl, C.C. Malbon, R.T. Moon, Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12701–12711.
- [41] K.J. Lee, T.M. Jessell, The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 261–294.
- [42] J.P. Liu, E. Laufer, T. Jessell, Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids, *Neuron* 32 (2001) 997–1012.
- [43] J. Liu, S. Wilson, T. Reh, BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina, *Dev. Biol.* 256 (2003) 34–48.
- [44] Y. Liu, J. Berndt, F. Su, H. Tawarayama, W. Shoji, J.Y. Kuwada, M.C. Halloran, Semaphorin3D guides retinal axons along the dorsoventral axis of the tectum, *J. Neurosci.* 24 (2004) 310–318.
- [45] H. Long, C. Sabatier, L. Ma, A. Plump, W. Yuan, D.M. Ornitz, A. Tamada, F. Murakami, C.S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance, *Neuron* 42 (2004) 213–223.
- [46] W. Lu, V. Yamamoto, B. Ortega, D. Baltimore, Mammalian Ryk is a wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth, *Cell* 119 (2004) 97–108.
- [47] M. Lustig, L. Erskine, C.A. Mason, M. Grumet, T. Sakurai, Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions, *J. Comp. Neurol.* 21 (2001) 13–28.
- [48] A.I. Lyuksyutova, C.C. Lu, N. Milanese, L.A. King, N. Guo, Y. Wang, J. Nathans, M. Tessier-Lavigne, Y. Zou, Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signalling, *Science* 302 (2003) 1984–1988.

- [49] R. Macdonald, J. Scholes, U. Strahle, C. Brennan, N. Holder, M. Brand, S.W. Wilson, The Pax protein *Noi* is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain, *Development* 124 (1997) 2397–2408.
- [50] V. Marigo, R.A. Davey, Y. Zuo, J.M. Cunningham, C.J. Tabin, Biochemical evidence that patched is the hedgehog receptor, *Nature* 384 (1996) 176–179.
- [51] O. Marin, J.L. Rubenstein, Cell migration in the forebrain, *Annu. Rev. Neurosci.* 26 (2003) 441–483.
- [52] E. Marti, P. Bovolenta, Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 89–96.
- [53] S. Martinez, M. Wassef, R.M. Alvarado-Mallart, Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*, *Neuron* 6 (1991) 971–981.
- [54] S. Martinez, P.H. Crossley, I. Cobos, J.L. Rubenstein, G.R. Martin, FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression, *Development* 126 (1999) 1189–1200.
- [55] C.A. Mason, D.W. Sretavan, Glia, neurons and axon pathfinding during optic chiasm development, *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (1997) 647–653.
- [56] S. McFarlane, E. Cornel, E. Amaya, C.E. Holt, Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition, *Neuron* 17 (1996) 245–254.
- [57] W.J. Nelson, R. Nusse, Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways, *Science* 303 (2004) 1483–1487.
- [58] C.J. Neumann, C. Nuesslein-Volhard, Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity, *Science* 289 (2000) 2137–2139.
- [59] S. Ramon y Cajal, La rétine des vertébrés, *La Cellule IX* (1893) 119–258.
- [60] B. Reuss, O. von Bohlen und Halbach, Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system, *Cell Tissue Res.* 313 (2003) 139–157.
- [61] C. Sabatier, A.S. Plump, Le Ma, K. Brose, A. Tamada, F. Murakami, E.Y. Lee, M. Tessier-Lavigne, The divergent Robo family protein *rig-1/Robo3* is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons, *Cell* 16 (2004) 157–169.
- [62] T. Saneyoshi, S. Kume, Y. Amasaki, K. Mikoshiba, The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos, *Nature* 417 (2002) 295–299.
- [63] S.B. Selleck, Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics, *Trends Genet.* 16 (2000) 206–212.
- [64] T. Serafini, S.A. Colamarino, E.D. Leonardo, H. Wang, R. Bedington, W.C. Skarnes, M. Tessier-Lavigne, Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system, *Cell* 87 (1996) 1001–1014.
- [65] S. Shanmugalingam, C. Houart, A. Picker, F. Reifers, R. Macdonald, A. Barth, K. Griffin, M. Brand, S.W. Wilson, *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon, *Development* 127 (2000) 2549–2561.
- [66] L.C. Sheldahl, M. Park, C.C. Malbon, R.T. Moon, Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and frizzled homologs in a G-protein-dependent manner, *Curr. Biol.* 9 (1999) 695–698.
- [67] L.C. Sheldahl, D.C. Slusarski, P. Pandur, J.R. Miller, M. Kuhl, R.T. Moon, Dishevelled activates Ca^{2+} flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 769–777.
- [68] D.C. Slusarski, V.G. Corces, R.T. Moon, Interaction of Wnt and a frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling, *Nature* 390 (1997) 410–413.
- [69] D.M. Snow, D.A. Steindler, J. Silver, Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier, *Dev. Biol.* 138 (1990) 359–376.
- [70] H. Song, M. Poo, The cell biology of neuronal navigation, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 81–88.
- [71] H. Spemann, Anatomischen. Anzeiger. 15 (1901) 16–79.
- [72] H. Spemann, H. Mangold, Über induktion von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren, *Arch. Mikrosk. Anat. Entwickl. Mech.* 100 (1924) 599–638.
- [73] T. Tabata, Y. Takei, Morphogens, their identification and regulation, *Development* 131 (2004) 703–712.
- [74] S. Testaz, A. Jarov, K.P. Williams, L.E. Ling, V.E. Kotliansky, C. Fournier-Thibault, J.L. Duband, Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the patched-smoothed-gli signalling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23 (2001) 12521–12526.
- [75] M. Torres, E. Gomez-Pardo, P. Gruss, Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory, *Development* 122 (1996) 3409–3418.
- [76] E. Trivier, T.S. Ganesan, Ryk, a catalytically inactive receptor tyrosine kinase, associates with EphB2 and EphB3 but does not interact with AF-6, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23037–23043.
- [77] F. Trousse, P. Esteve, P. Bovolenta, BMP4 mediates apoptotic cell death and proliferation in the chick optic cup, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1292–1301.
- [78] F. Trousse, E. Marti, P. Gruss, M. Torres, P. Bovolenta, Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for sonic hedgehog, *Development* 128 (2001) 3927–3936.
- [79] H.H. Tsai, R.H. Miller, Glial cell migration directed by axon guidance cues, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 173–175.
- [80] F.P. van Horeck, C. Weinl, C.E. Holt, Retinal axon guidance: novel mechanisms for steering, *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004) 61–66.
- [81] A. Varela-Echavarría, A. Tucker, A.W. Puschel, S. Guthrie, Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D, *Neuron* 18 (1997) 193–207.
- [82] Z.M. Varga, A. Amores, K.E. Lewis, Y.L. Yan, J.H. Postlethwait, J.S. Eisen, M. Westerfield, Zebrafish *smoothed* functions in ventral neural tube specification and axon tract formation, *Development* 128 (2001) 3497–3509.
- [83] V.A. Wallace, M. Raff, A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve, *Development* 126 (1999) 2901–2909.
- [84] D.E. Wallis, M. Muenke, Molecular mechanisms of holoprosencephaly, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 126–138.
- [85] F.S. Walsh, P. Doherty, Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1997) 425–456.
- [86] A. Walz, S. McFarlane, Y.G. Brickman, V. Nurcombe, P.F. Bartlett, C.E. Holt, Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system, *Development* 124 (1997) 2421–2430.
- [87] Y. Wang, N. Thekdi, P.M. Smallwood, J.P. Macke, J. Nathans, *Frizzled-3* is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS, *J. Neurosci.* 22 (2002) 8563–8573.
- [88] S.E. Williams, C.A. Mason, E. Herrera, The optic chiasm as a midline choice point, *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004) 51–60.
- [89] S.W. Wilson, C. Houart, Early steps in the development of the forebrain, *Dev. Cell* 6 (2004) 167–181.
- [90] Y. Xiang, Y. Li, Z. Zhang, K. Cui, S. Wang, X.B. Yuan, C.P. Wu, M.M. Poo, S. Duan, Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors, *Nat. Neurosci.* 5 (2002) 843–848.
- [91] T.P. Yamaguchi, J. Rossant, Fibroblast growth factors in mammalian development, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 (1995) 485–491.
- [92] S. Yoshikawa, R.D. McKinnon, M. Kokel, J.B. Thomas, Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* *derailed* receptor, *Nature* 422 (2003) 583–588.
- [93] J. Zhang, Z. Jin, Z.Z. Bao, Disruption of gradient expression of *Zic3* resulted in abnormal intra-retinal axon projection, *Development* 131 (2004) 1553–1562.
- [94] Y. Zou, E. Stoeckli, H. Chen, M. Tessier-Lavigne, Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord, *Cell* 102 (2000) 363–375.

Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease

Paola Bovolenta^{1,2,*}, Pilar Esteve^{1,2}, Jose Maria Ruiz^{1,2}, Elsa Cisneros^{1,2} and Javier Lopez-Rios¹

¹Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo, Instituto Cajal, CSIC, Dr Arce 37, Madrid 28002, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

*Author for correspondence (e-mail: bovolenta@cajal.csic.es)

Accepted 28 January 2008

J. Cell Sci. 121, 737–746 Published by The Company of Biologists 2008
doi:10.1242/jcs.026096

Summary

The secreted Frizzled-related proteins (SFRPs) are a family of soluble proteins that are structurally related to Frizzled (Fz) proteins, the serpentine receptors that mediate the extensively used cell-cell communication pathway involving Wnt signalling. Because of their homology with the Wnt-binding domain on the Fz receptors, SFRPs were immediately characterised as antagonists that bind to Wnt proteins to prevent signal activation. Since these initial studies, interest in the family of SFRPs has grown progressively, offering new perspectives on their function and mechanism of action in both development and disease. These studies indicate that SFRPs are not merely Wnt-binding proteins, but can also antagonise

one another's activity, bind to Fz receptors and influence axon guidance, interfere with BMP signalling by acting as proteinase inhibitors, and interact with other receptors or matrix molecules. Furthermore, their expression is altered in different types of cancers, bone pathologies, retinal degeneration and hypophosphatemic diseases, indicating that their activity is fundamental for tissue homeostasis. Here we review some of the debated aspects of SFRP-Wnt interactions and discuss the new and emerging roles of SFRPs.

Key words: Bmp, Signalling antagonists, Cancer, Diseases

Introduction

The specification, differentiation and coordinated behaviour of tissues in multicellular organisms all require tight control of cell-to-cell communication. Intensive research in recent decades has determined that many such processes in vertebrates and invertebrates are orchestrated by secreted signalling molecules that belong to a small number of gene families. Among these, Hedgehog (Hh), Wingless (Wnt), transforming growth factor β (TGF β), bone morphogenetic protein (BMP) and fibroblast growth factor (FGF) protein families are of particular importance because of their pleiotropic activities during both development and maintenance of most tissues (Bovolenta and Marti, 2005). Members of these families commonly bind to specific cell-surface receptors and activate complex intracellular cascades that ultimately regulate gene transcription and modify cell behaviour according to the specific needs of the target cells. Because cells must change progressively, especially during embryonic development, it is crucial for the cell to receive the appropriate inputs at the correct time. To ensure that these inputs are adequately controlled, cell signalling pathways are tightly regulated at different levels. The Wnt signalling pathway provides a good example of these multiple controls.

The Wnt proteins are a large family of palmitoylated secreted glycoproteins that activate at least three different signalling pathways: the canonical or Wnt- β -catenin, the planar cell polarity (PCP; also known as non-canonical) and the Wnt-Ca²⁺ pathways (Bovolenta et al., 2006). Wnt activity is regulated at the cell surface by different transmembrane proteins and the secretion of Wnt proteins from the cell is promoted by the recently discovered protein Wntless (Wls) (Banziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006). Once secreted, Wnt proteins interact with

glycosaminoglycans in the extracellular matrix, and these modulate their distribution, diffusion and signal transduction (Logan and Nusse, 2004). Frizzled (Fz) receptors on the receiving cells – seven-pass transmembrane proteins with the characteristics of G-protein-coupled receptors – are the main proteins responsible for binding to Wnt proteins on the plasma membrane. However, additional molecules are implicated in the activation of the signalling pathway. These comprise low-density lipoprotein-receptor-related proteins [LRP5 and LRP6 in vertebrates and Arrow (Arr) in *Drosophila*] that function as Fz co-receptors; the tyrosine kinase receptor Ror2, which contains a cysteine-rich domain similar to that of Fz; and the atypical tyrosine kinase receptor Derailed (Drl) and the related tyrosine kinase protein (Ryk), which can interact with Fz (Bovolenta et al., 2006). Activation of Wnt signalling is further controlled by different antagonists, including Wnt inhibitory factor 1 (WIF1), Cerberus, Sclerostin, and members of the Dickkopf and secreted Frizzled-related protein (SFRP) families. Sclerostin and Dickkopf proteins interfere with Wnt activity and antagonise canonical signalling by binding to LRP5 or LRP6, whereas WIF1, Cerberus and SFRPs can interact directly with Wnt proteins (Kawano and Kypta, 2003; Li et al., 2005). Notably, WIF1 is characterised by the so called WIF domain, which is present also in the extracellular domain of Ryk and seems to be responsible for Wnt binding (Hsieh et al., 1999).

The SFRPs are the largest family of Wnt inhibitors. The founding member Frzb was initially identified through its sequence similarity with the Fz receptors (Hoang et al., 1996; Leyns et al., 1997), and immediately associated with Wnt signalling because of its ability to bind to Wnt8 and block its signalling in *Xenopus*, strongly supporting its role as a Wnt antagonist (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997). Concurrently, additional members of the family

were isolated either through sequence homology with Fz receptors (Rattner et al., 1997) or, independently of Wnt activity, through their involvement in apoptosis (Melkonyan et al., 1997), or their co-purification with the heparin-binding factor hepatocyte growth factor/scattered factor (Finch et al., 1997).

Since their discovery, interest in this family of molecules has grown progressively, particularly because recent observations have offered a new perspective on their functions and mechanisms of action in both development and disease. These studies indicate that SFRPs are not merely Wnt-binding proteins but can also antagonise one another's activity (Yoshino et al., 2001), bind to Fz receptors (Bafico et al., 1999; Rodriguez et al., 2005) and provide axon-guidance information (Rodriguez et al., 2005). Moreover, they can interact with other receptors or matrix molecules (Chuman et al., 2004; Hausler et al., 2004; Lee, J. et al., 2004) and interfere with BMP signalling (Lee, H. et al., 2006; Muraoka et al., 2006; Yabe et al., 2003) by acting as proteinase inhibitors (Lee, H. et al., 2006). Furthermore, their expression is altered in different types of cancers (Rubin et al., 2006), in bone pathologies (Bodine and Komm, 2006), retinal degeneration (Jones et al., 2000) and hypophosphatemic diseases (Berndt and Kumar, 2007), which indicates that their activity is fundamental for tissue homeostasis. Reviews that centre on Wnt antagonism by SFRPs have recently been published elsewhere (Cadigan and Liu, 2006; Jones and Jomary, 2002; Kawano and Kypta, 2003); here, we discuss new aspects of SFRP activity, and review SFRP structure, expression and interactions with Wnt proteins.

The family of SFRPs

The SFRP family comprises five members in humans, SFRP1 to SFRP5, in which SFRP5 is the orthologue of the founding member Frzb. Sequence comparison and phylogenetic analysis show that SFRP1, SFRP2 and SFRP5 are closely related, and cluster together in a subgroup that diverges from the one formed by the related SFRP3 and SFRP4 (Fig. 1). This clustering also reflects a different genomic organisation. SFRP1, SFRP2 and SFRP5 are encoded by three exons on chromosome 8p12-p11.1, 4q31.3 and 10q24.1, respectively (Garcia-Hoyos et al., 2004), whereas SFRP3 and SFRP4 are both encoded by six exons – on chromosome 2q31-q33 and 7p14-p13, respectively. Orthologues of the five human genes have been found in all vertebrate species analysed so far (Fig. 1). Notably, a third subgroup, apparently not present in mammals, has been identified in *Xenopus*, zebrafish and chick. The components of this subgroup, named Sizzled, Crescent and Tlc, share sequence similarities with the SFRP1-SFRP2-SFRP5 subgroup (Fig. 1), and are characterised by a very restricted and anterior expression in gastrulating embryos (Bradley et al., 2000; Collavin and Kirschner, 2003; Chapman et al., 2004; Houart et al., 2002; Pfeffer et al., 1997; Salic et al., 1997; Yabe et al., 2003).

To date, SFRP homologues have not been identified in the *Drosophila* genome but family members that contain both a cysteine-rich domain (CRD) and a netrin (NTR) domain (see below) have been found in other invertebrates (Fig. 1), including the purple sea urchin (Lapraz et al., 2006), the nematode *Caenorhabditis elegans* (AC084197), the sea squirt *Ciona intestinalis* (Hino et al., 2003) and even in the sponge *Lubomirskia baicalensis* (Adell et al., 2007), which highlights the ancient origin of SFRPs. In addition, a protein related to SFRPs is expressed in sea urchin in a developmentally regulated pattern. This protein contains a putative signal sequence, four CRDs and a single Ig domain but lacks the NTR domain (Illies et al., 2002).

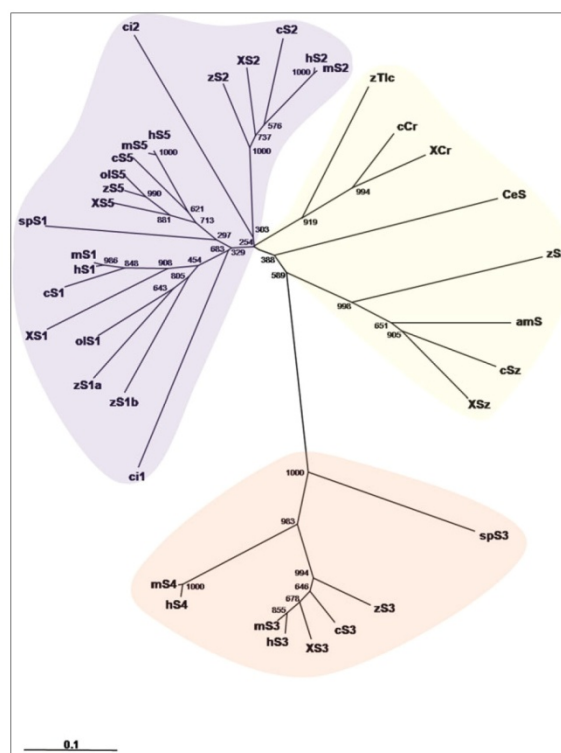


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the SFRP family obtained by comparison of the CRD amino-acid sequences. Members displaying the most similarities in amino acid sequences cluster together and the branch length is proportional to divergence (percentage of nucleotide changes). Numbers indicate the bootstrap confidence for each node ($n=1000$). Different subfamilies are coloured differently. am, *Ambystoma mexicanum* (axolotl); c, *Gallus gallus* (chick); Ce, *Caenorhabditis elegans* (nematode); ci, *Ciona intestinalis* (sea squirt); Cr, Crescent; h, *Homo sapiens* (human); m, *Mus musculus* (mouse); ol, *Oryzias latipes* (medaka fish); S, Sfrp; sp, *Strongylocentrotus purpuratus* (sea urchin); Sz, Sizzled; X, *Xenopus laevis* (African clawed frog); z, *Danio rerio* (zebrafish).

Whereas the distribution of Sizzled, Crescent and Tlc is temporally and spatially very restricted, other SFRPs in different vertebrate embryos are expressed widely throughout development. *Sfrp1* (Fig. 2A,B) as well as *Sfrp2* and *Sfrp3* are expressed in the anterior neural plate from early developmental stages. Their expression pattern changes considerably over time, because they are subsequently found – among others – in the posterior neural tube, somites, limbs and kidney, (Fig. 2C,D) (Chapman et al., 2004; Esteve et al., 2004; Esteve et al., 2000; Leimeister et al., 1998; Leyns et al., 1997; Tendeng and Houart, 2006). In some cases, individual SFRPs are expressed in a partially overlapping manner that might be complementary to the expression of certain Wnt proteins, suggesting that in some cases there is some functional redundancy in their activity as Wnt inhibitors. Indeed, there is severe shortening of the thoracic region and incomplete somite segmentation in *Sfrp1-Sfrp2* double-mutant embryos, but not in either single mutant (Satoh et al., 2006). In other cases, expression of SFRPs appears to be independent of Wnt-protein distribution: in the mouse telencephalon, *Sfrp1* and *Sfrp3* are localised in

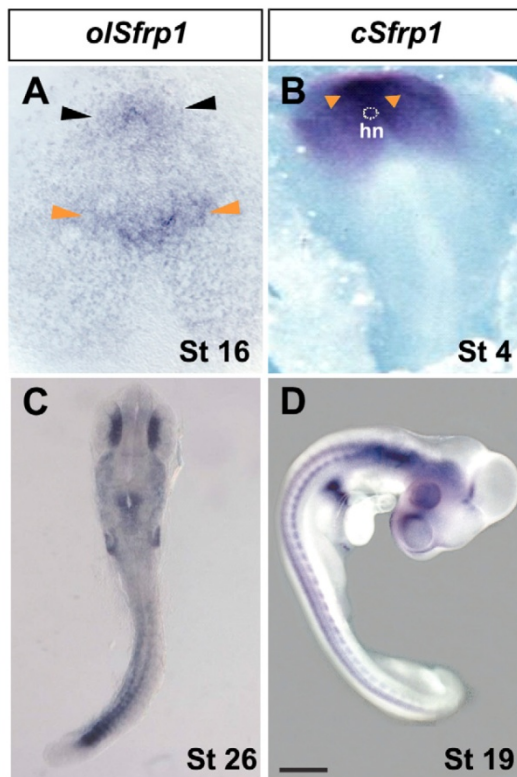


Fig. 2. Expression of *Sfrp1* in the anterior part of the embryo of medaka fish *Oryzias latipes* (olSfrp1) and chick (cSfrp1). (A-D) Panels show dorsal views of medaka fish (A,C) and chick (B,D) embryos hybridised in toto with digoxigenin-labelled species-specific probes against Sfrp. Gene transcripts accumulate in the most-anterior neural plate (black arrowheads in A) at mid-gastrula stages in both species. In both species expression is particularly abundant in the prospective eye field (orange arrowheads in A and B). In fish, expression is also observed in the future midbrain-hindbrain boundary (black arrowheads in A). During organogenesis (C,D) *Sfrp1* expression is observed in the eye, otic vesicles, neural tube, somites and limb buds. hn, Hensen's node; St, embryonic stage, numbers indicate days. Scale bar in D: 50 µm for A, 125 µm for B, 100 µm for C, 500 µm for D.

opposing gradients (Kim et al., 2001), and in the chick and mouse retina *Sfrp1* and *Sfrp2* are distributed throughout the neural retina (Esteve et al., 2003; Liu et al., 2003), whereas *Sfrp5* localises to the retinal pigmented epithelium (Chang et al., 1999).

Although the regulation of SFRP expression has not been systematically analysed, there is evidence that in embryonic fibroblasts *Sfrp1* is a direct target of the Sonic hedgehog (Shh) pathway. The Shh effector glioblastoma 1 (Gli1) binds to a conserved consensus site in the *Sfrp1* promoter and activates its transcription (He et al., 2006). By contrast, Shh-mediated repression of *Sfrp1* and *Sfrp2* has been reported in mesenchymal cells (Ingram et al., 2002), whereas the transcription factor Myc seems to bind and strongly repress the *SFRP1* promoter in human mammary epithelial cells (Cowling et al., 2007). There is also good evidence that *Sfrp1* and *Sfrp2* expression in the stomach mesenchyme is directly regulated by the conserved homeobox protein BarH-like homeobox gene 1 (Barx1), which is required to

promote differentiation of the abutting stomach epithelium (Kim et al., 2005). Furthermore, LIM homeobox protein 5 (Lhx5), a LIM homeodomain transcription factor, directly activates the expression of *Sfrp1a* and *Sfrp5*, which, in turn, promote development of zebrafish forebrain (Peng and Westerfield, 2006). Likewise, the expression of *C. intestinalis Sfrp1* and/or *Sfrp5* under the direct control of Ci-FoxA-a, a FoxA/HNF3 orthologue, may protect the ascidian anterior ectoderm from posteriorising signals that are known to caudalise the neurectoderm (Lamy et al., 2006). In addition, signalling through Wnt and BMP as well as the transcription factor Pax6 are thought to modify the levels of *Sfrp1* and *Sfrp2* transcripts in different tissues (Kim et al., 2001; Wawersik et al., 1999), although it remains unclear whether this regulation is direct.

Structural features of SFRPs

SFRPs are modular proteins that fold into two independent domains (Chong et al., 2002). The N-terminus contains a secretion signal peptide followed by a CRD. The CRD is characterised by the presence of ten cysteine residues at conserved positions, which form a pattern of disulphide bridges (Chong et al., 2002) identical to that reported for the extracellular CRD domains of Fz and Ror1 (Roszmusz et al., 2001). Members of the Sizzled-Crescent subgroup contain an additional cysteine residue that might form an interdomain disulphide bridge (Chong et al., 2002).

The C-terminal part of SFRP proteins is characterised by segments of positively charged residues that appear to confer heparin-binding properties (Uren et al., 2000), and by six cysteine residues that form three disulphide bridges. These features, which define the NTR module, have been identified in several other proteins, including netrin 1 (a well-characterised axon-guidance molecule), tissue inhibitors of metalloproteinases, type 1 procollagen C-proteinase enhancer protein (PCOLCE), and the complement component proteins C3, C4 and C5 (Banyai and Patthy, 1999). The NTRs of SFRP1, SFRP2 and SFRP5 share a similar pattern of cysteine spacing that is related to that of netrin 1, whereas those of the SFRP3-SFRP4 subgroup display a different cysteine-spacing pattern and, thus, a distinct pattern of disulphide bonds (Chong et al., 2002).

Post-translational modifications appear to confer additional differences that might further diversify the functions of different SFRP family members. For example, SFRP1 is N-glycosylated [shifting by approximately 2.8 kDa (Chong et al., 2002)], and sulphated at two tyrosine residues that are highly conserved in SFRP5 but absent from SFRP2, SFRP3 and SFRP4. This tyrosine sulphation is inhibited by heparin and appears to partially destabilise the protein (Zhong et al., 2007), suggesting that heparan sulphate influences protein stability in vivo.

Binding sites and specificity of Wnt-SFRP interactions: two unresolved issues

Following the discovery of SFRPs, biochemical studies established that Wnt proteins and SFRPs interact physically, with the SFRP-CRD postulated to be the binding domain because of its homology with the proposed Wnt-binding region on Fz receptors (Leyns et al., 1997; Lin et al., 1997; Wang et al., 1997). This interaction was proposed to impede Wnt binding to the Fz receptor and, therefore, prevent signal transduction (Fig. 3A). Indeed, complete removal of the SFRP3 CRD abolishes Wnt1-SFRP3 binding and ablates inhibition of Wnt1-mediated axis duplication in *Xenopus* embryos. By contrast, removal of the SFRP3 NTR only attenuates the

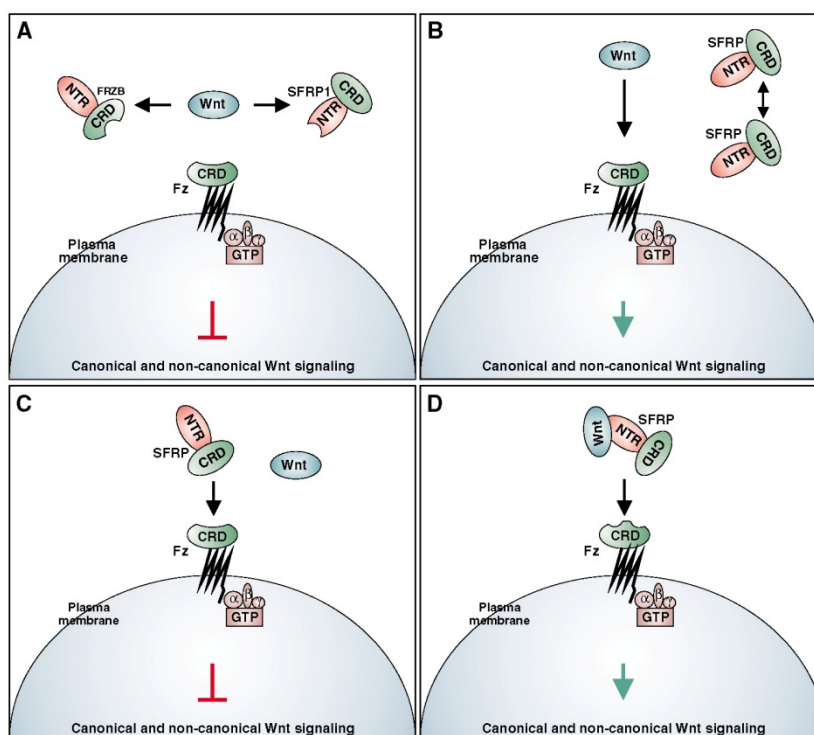


Fig. 3. Possible mechanisms by which SFRPs could modulate Wnt signalling. (A) SFRPs could sequester Wnt either through the CRD or NTR domain, thereby acting as classical antagonists. (B) They could titrate one another's activity, thereby favouring Wnt signalling. (C) SFRPs could act in a dominant-negative fashion by forming signalling-inactive complexes with Fz receptors, thereby preventing signal transduction by Wnt. (D) SFRPs might favour a Wnt-Fz interaction by simultaneously binding to both molecules and promoting signal transduction.

inhibition of axis duplication (Lin et al., 1997). Evidence for an interaction between the SFRP-CRD and Wnt was strengthened when complexes of SFRP1 and Wnt1 or Wnt2 were detected (Bafico et al., 1999). However, mutants of the human SFRP1 protein lacking the CRD retained the ability to bind to Wingless (Wg), the *Drosophila* Wnt homologue, whereas deletion of the NTR resulted in a reduction or loss of Wg binding (Uren et al., 2000). These apparently contradictory results might imply that multiple Wnt-binding sites exist on SFRP molecules, and/or that SFRP-Wnt pairs associate with differential affinities according to the different conformational and post-translational modifications of the SFRP described above. Indeed, as detailed below, there are experimental data supporting both possibilities.

A recent study of SFRP1 structure and function indicates that both domains of the protein are necessary for optimal Wnt inhibition. A conserved tyrosine residue within the CRD plays a crucial role in this process, together with the last 19 amino acid residues of the NTR, the deletion or replacement of which clearly interfere with SFRP1 function (Bhat et al., 2007). Furthermore, plasmon-resonance binding studies using SFRP1 to SFRP4, and Wnt3a and Wnt5, show that Wnt5 binds exclusively to SFRP1 and SFRP2, whereas Wnt3a binds to at least two sites in SFRP1, SFRP2 and SFRP4, and one in SFRP3. Notably, although the binding affinities for all SFRP-Wnt pairs tested were in the nanomolar range – very similar to those observed for the Wnt-Fz interaction (Wu and Nusse, 2002) – only SFRP1 and SFRP2 could inhibit Wnt3a-mediated β -catenin accumulation in cultured cells (Wawrzak et al., 2007). Several additional studies have indicated possible biochemical and/or functional specificity in the SFRP-

Wnt interactions in the neural tube (Galli et al., 2006), somites (Borello et al., 1999; Lee et al., 2000), vascular endothelium (Dennis et al., 1999), and developing heart (Eisenberg and Eisenberg, 2006; Schneider and Mercola, 2001). Furthermore, Wnt-induced embryonic axis duplication and forebrain development in *Xenopus* have been used to determine the efficiency of given SFRPs to counteract specific Wnt activities, sometimes obtaining contrasting results (Bradley et al., 2000; Finch et al., 1997; Lin et al., 1997; Pera and De Robertis, 2000).

One conclusion from the studies described above is that SFRPs do not bind to Wnt proteins in an equivalent manner, neither in terms of specificity and number of binding sites nor in terms of interaction domains. However, achieving a systematic classification of SFRP-Wnt interactions may be hindered by the relatively large number of different Wnt ligands and their poor solubility, which makes their purification difficult (Logan and Nusse, 2004). Furthermore, the determination of binding affinities might not be sufficient to understand how SFRPs antagonise Wnt signalling because biochemically demonstrated Wnt-SFRP interactions are not necessarily functional in living cells (Lin et al., 1997; Wawrzak et al., 2007). This suggests that additional molecules modulate SFRP-Wnt activities *in vivo*. Glycosaminoglycans are certainly good candidate modulators (Uren et al., 2000) because they bind and regulate Wnt-protein diffusion (Logan and Nusse, 2004), and facilitate SFRP secretion and accumulation (Finch et al., 1997; Uren et al., 2000; Zhong et al., 2007). Alternatively, the activities of different SFRPs *in vivo* could reflect their ability to interfere with different Wnt signalling pathways, thereby modulating different events within the same

tissue (e.g. cell specification vs cell movement). Thus, interference with different SFRPs could generate different phenotypes.

Different SFRPs may have opposing effects on the same process

The possibility that different SFRPs have opposing effects on the same process has been suggested to explain the activities displayed by Crescent and Frzb during *Xenopus* head development. Despite the overlapping distribution of the two proteins in the prechordal plate and anterior endoderm, Crescent overexpression leads to cyclopia and reduction in size of anterior structures, whereas Frzb enlarges anterior structures without affecting proximo-distal patterning of the eye (Pera and De Robertis, 2000). These results could be reconciled if Frzb were to interfere with canonical Wnt signalling and Crescent with the non-canonical pathway, which underlies the control of morphogenetic movements (Pera and De Robertis, 2000). Indeed, this possibility is supported by the observation that Cdc42, a putative mediator of non-canonical signalling, can antagonise the effects of Crescent (Shibata et al., 2005). Differential antagonism of canonical and non-canonical signalling has also been proposed (Esteve and Bovolenta, 2006) to explain the different phenotypes observed after the knockdown of Tlc (Houart et al., 2002) and SFRP1 (Esteve et al., 2004) during telencephalic and eye development in fish.

Other, as yet unclear, mechanisms might underlie the opposing effects of SFRPs on apoptosis in breast tumours. As mentioned above, SFRPs were independently identified as secreted apoptosis-related proteins (SARPs) during a search for inhibitors of the apoptotic programme (Melkonyan et al., 1997). These studies revealed that, despite their high degree of homology, the identified proteins elicited different cellular responses in breast adenocarcinoma cells. SFRP2 (named SARP1 in Melkonyan et al., 1997) promotes β -catenin accumulation and increases cell resistance to apoptosis induced by various agents, whereas SFRP1 (named SARP2 in Melkonyan et al., 1997) favours cell death and diminishes β -catenin stability (Melkonyan et al., 1997). However, it is unclear how these observations are related to other situations in which the effects of SFRPs in apoptosis have been evaluated in cells and in vivo. For example, SFRP1 diminishes the apoptosis of dermal fibroblasts (Han and Amar, 2004), whereas SFRP2 promotes apoptosis that is associated with developmental tissue patterning in chick embryos (Ellies et al., 2000). Similarly, SFRP4 favours apoptosis that leads to the involution of the mammary gland after weaning, when the differentiated mammary epithelium is no longer needed (Lacher et al., 2003). In this case, SFRP4-mediated apoptosis involves the suppression of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt and the protein kinase B (PKB)/Akt survival pathways, possibly through a mechanism that is independent of canonical Wnt signalling (Lacher et al., 2003).

If apoptosis and the establishment of anterior structures are events in which different SFRPs exert opposing effects, kidney development is an example of how SFRPs can antagonise each other's activity. Both SFRP1 and SFRP2 are expressed during metanephric kidney development. In cultures of embryonic rat metanephros, SFRP1 blocks kidney-tubule formation and bud branching (Yoshino et al., 2001), processes that depend on Wnt4 activity in vivo (Kispert et al., 1998). Exposure to SFRP2 alone has no effect, but in the presence of both SFRPs, SFRP2 blocks SFRP1-mediated effects and partially restores tubule differentiation and bud branching. Binding of the Wnt effector transcription factor T cell factor (TCF) to DNA from metanephric

mesenchyme is inhibited by SFRP1 but not by SFRP2, suggesting that SFRP2 does not inhibit Wnt signalling (Yoshino et al., 2001). Rather, SFRP2 could bind to and antagonise SFRP1 and/or potentiate Wnt signalling, as reported for SFRP1, which can promote Wg-mediated signalling at low concentrations but represses it at high concentrations (Uren et al., 2000). Different biochemical and crystallographic data support both possibilities, introducing the interesting idea that SFRPs can interact not only with Wnt but also with Fz receptors.

SFRPs bind to, and possibly activate, Frizzled receptors

The crystallographic resolution of the structure of the mouse SFRP3 and Fz8 CRD domains suggested that CRDs might be able to homodimerise or heterodimerise (Dann et al., 2001). This possibility has also been demonstrated in biochemical studies in which SFRPs and Fz proteins and/or their CRDs have been shown to form homo- and heteromeric complexes (Bafico et al., 1999; Carron et al., 2003; Rodriguez et al., 2005). These results provide a possible molecular basis for some of the diverse observations of SFRP activity described above, and suggest a number of different mechanisms by which SFRPs can modulate Wnt signalling. SFRPs may act in the following ways: (1) by sequestering Wnt through the CRD or NTR domains, thereby acting as classical antagonists (Fig. 3A); (2) by titrating out one another's activity and thereby favouring Wnt signalling (Fig. 3B); (3) by acting in a dominant-negative manner through the formation of inactive complexes with Fz receptors that prevent signal activation (Fig. 3C) (Bafico et al., 1999); or (4) by favouring Wnt-Fz interactions by simultaneously binding to both molecules and promoting signal activation (Fig. 3D) (Uren et al., 2000).

The final mechanism, which implies binding of the SFRP CRD to the Fz receptor, also raises the possibility of a different scenario in which, in the absence of Wnt proteins, a CRD-CRD interaction may be sufficient to activate signal transduction. This appears to be the case for Fz3 in *Xenopus* embryos, in which Fz3 receptors form homodimers through their CRD domain when overexpressed in blastula cap cells, a process sufficient to activate the β -catenin pathway. Dimer formation is unaffected by Wnt expression, supporting a ligand-independent mechanism of canonical signalling activation (Carron et al., 2003). Recent work from our laboratory provides another example of a Wnt-independent mechanism that is based on heterodimer formation. Our work also illustrates a novel function for SFRP1 as an axon guidance molecule (Fig. 4) (Rodriguez et al., 2005). In various vertebrates, SFRP1 is strongly expressed in crucial regions of the visual pathway. Consistent with this distribution, SFRP1 behaves like a Wnt-independent axon guidance cue, and modifies the behaviour of retinal ganglion cell (RGC) growth cones in several in vitro and in vivo assays (Rodriguez et al., 2005). The search for a receptor that could mediate this effect demonstrated that Fz2, which is expressed in RGCs, interacts with the CRD of SFRP1 (Rodriguez et al., 2005) (P.E., unpublished data). Furthermore, interference with Fz2 expression abolishes SFRP1-mediated activity on RGC growth cones, indicating that, in axon guidance at least, SFRP1 is an active ligand of Fz-mediated signalling (Fig. 4). Notably, the activation of the Fz receptors by a proposed ligand antagonist is not unique to SFRP1: Dickkopf2, which belongs to a different family of Wnt antagonists, can activate Wnt canonical signalling by cooperating with at least three different Fz proteins (Wu et al., 2000).

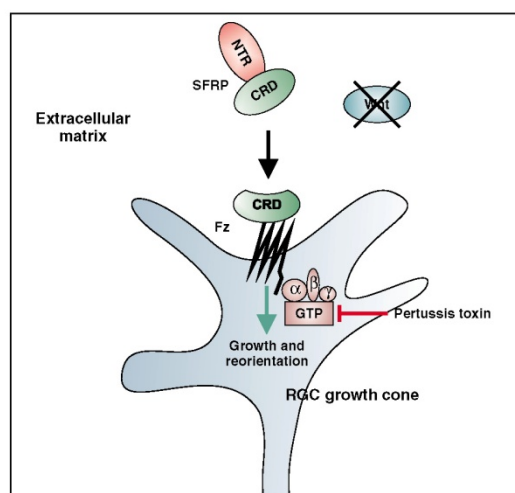


Fig. 4. Proposed mechanism of SFRP1 activity as an axon guidance cue. SFRP1 can directly modify and reorient the growth of retinal ganglion cell growth cones. This activity does not require Wnt inhibition and is mediated by Fz2. It requires pertussis-toxin-sensitive activation of Gα protein, involves protein synthesis and degradation, and is modulated by different levels of cAMP and cGMP (Rodríguez et al., 2005).

SFRPs interacts with molecules that are unrelated to Wnt signalling

Most of the functions of SFRPs that have been discussed so far relate to the effect of SFRPs on Wnt signalling in one way or another. However, SFRPs appear to be promiscuous proteins that can interact with molecules that are unrelated (to the best of our knowledge) to components of the Wnt signalling cascades and among which there is no apparent relationship. These include fibronectin, Unc5H3, receptor activator for nuclear factor kappa B

(NF-κB) ligand (RANKL) and bone morphogenetic protein (BMP)/Tollid.

SFRP2 enhances the viability of mammary tumour cells by protecting them from apoptotic stimuli (Lee, A. et al., 2004; Melkonyan et al., 1997). This effect can be explained by the accumulation of SFRP2 secreted by tumour cells in the extracellular matrix and its physical interaction with the fibronectin-integrin complex (Fig. 5A). Addition of SFRP2 to the complex favours cell adhesion and enhances viability (Lee, J. et al., 2004), possibly through the phosphorylation of the focal adhesion kinase (FAK), the activation of NF-κB – thereby conferring resistance to apoptosis, and the suppression of activity of Janus kinases (JNKs) (Lee, J. et al., 2006) – stress-activated serine/threonine kinases that are involved in programmed cell death. Whether Wnt signalling participates in the regulation of apoptosis is so far unclear (Lisovsky et al., 2002); it is thus difficult to determine whether the anti-apoptotic effects that are mediated by SFRP2-fibronectin-integrin complexes represent SFRP activity that is totally independent of Wnt activity. Nevertheless, the sequence similarity of the SFRP NTR to that of other proteins present in the extracellular matrix – such as the aforementioned procollagen C-proteinase – and its interaction with heparin make this possibility attractive.

The screening of a phage display peptide library revealed that SFRP1 binds with high affinity to the peptide motif L/V-VDGRW-L/V, and showed that the DGR core is essential for binding. Surprisingly, this motif is absent from both Wnt and Fz; however, it is present in two otherwise unrelated proteins: Unc5H3 and RANKL (Chuman et al., 2004). Unc5H3 acts as a receptor in axon repulsion induced by netrin 1 in different neuronal populations (Round and Stein, 2007). Direct binding between SFRP1 and full-length Unc5H3 has not yet been tested. However, their possible interaction, particularly in the context of axon guidance, is a hypothesis worthy of investigation, especially because SFRP1 and netrin 1 expression patterns overlap in different regions of the CNS, and the properties of the two proteins as axon guidance cues have some interesting similarities (Rodríguez et al., 2005).

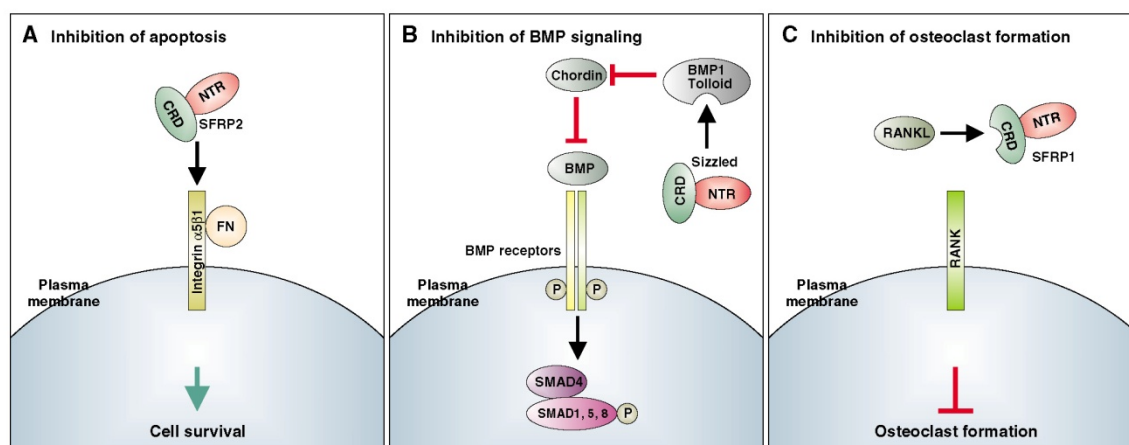


Fig. 5. SFRP interactions with molecules unrelated to Wnt signalling. (A) SFRP2 binds to the fibronectin (FN)–integrin-α5β1 complex, promoting cell adhesion and inhibiting apoptosis. (B) Sizzled binds to and inhibits the activity of BMP1/Tollid metalloproteinases that cleave chordin, a BMP signalling antagonist. Thus, Sizzled favours chordin stabilisation, which in turn inactivates BMP signalling. (C) SFRP1 interacts with RANKL, preventing it from binding to RANK, and thus inhibits osteoclast formation.

In contrast to binding studies using Unc5H3, those that used RANKL confirmed its interaction with SFRP1 when using the entire molecule (Fig. 5C). RANKL – a member of the tumour necrosis factor family – is a major promoter of osteoclast formation, which is inhibited by the association of SFRP1 and RANKL (Hausler et al., 2004). More importantly, *Sfrp1*-null mice show decreased apoptosis of osteoblasts and osteocytes, increased osteo-progenitor differentiation, enhanced bone formation and elevated bone mineral density (Bodine and Komm, 2006; Gaur et al., 2006), indicating a possible biological role for SFRP1 beyond Wnt modulation, although an alternative interpretation for this phenotype has been proposed (Fuentelba et al., 2007).

Although the physiological activities of SFRPs activated by Unc5H3, RANKL and fibronectin require further investigation, the activity of Sizzled as an inhibitor of BMP signalling seems to be well established through a number of complementary biochemical, functional and genetic studies. Sizzled was initially identified in *Xenopus* embryos as a putative Wnt8 antagonist (Salic et al., 1997) but subsequent analyses showed that it does not block Wnt signalling in vivo, although it binds to Wnt proteins in vitro. A mutation in the *sizzled* gene is responsible for the zebrafish *ogon* phenotype (Yabe et al., 2003), which is characterised by the expansion of ventral tissue, a feature also displayed by mutants of the BMP antagonist *chordin*. In *Xenopus* and zebrafish, the formation of the dorsoventral axis depends largely on BMP signalling (Lee, H. et al., 2006; Little and Mullins, 2006). Alteration of Sizzled protein expression in both species affects this axis, which is consistent with Sizzled acting as a negative feedback regulator of BMP signalling (Collavin and Kirschner, 2003; Yabe et al., 2003). An interesting mechanistic aspect is that Sizzled binds to BMP1/Tolloid, a metalloprotease that normally degrades chordin and thereby promotes BMP signalling. The Sizzled-BMP1/Tolloid interaction prevents chordin cleavage and stabilises it, thereby indirectly inhibiting BMP signalling (Fig. 5B) (Lee, H. et al., 2006; Muraoka et al., 2006). Specifically, Sizzled acts as a competitive inhibitor of the enzymatic activity of the BMP1/Tolloid metalloprotease as shown by careful biochemical studies, which demonstrate that Chordin and Sizzled compete with similar affinities for the substrate binding site of the enzyme (Lee, H. et al., 2006).

Since the Sizzled CRD mediates inhibition of BMP signalling, it is possible that other SFRP family members have similar functions. The two pairs that were tested, SFRP2/tolloid (Lee, H. et al., 2006) and BMP1/crescent (Muraoka et al., 2006), gave positive and negative results, respectively. Such a difference, however, should not be surprising given the emerging heterogeneous behaviour of SFRPs. Moreover, other studies point to the possible cross-talk between SFRPs and BMP signalling. Thus, overexpression of SFRP2 in the embryonic chick hindbrain inhibits expression of BMP4 and prevents programmed cell death (Ellies et al., 2000), which has been reported to be mediated by BMP4 in other structures (Trousse et al., 2001). In addition, Smad-interacting protein 1 (Sip1), a transcription factor implicated in BMP signalling, binds to the *Sfrp1* promoter and probably represses its expression, because *Sfrp1* expression is strongly upregulated in Sip1 mutants in association with a progressive apoptotic degeneration in the hippocampus (Miquelajauregui et al., 2007).

The roles of SFRPs in pathological events

Wnt proteins were first identified as mammary oncoproteins (van't Veer et al., 1984). Indeed, aberrant activation of canonical Wnt

signalling occurs in a large proportion of tumours, and is associated with the loss of controlled growth and the impairment of cell differentiation (Rubin et al., 2006). This constitutive activation of Wnt signalling is often associated with mutations in the downstream components of the pathway. Therefore, although one might expect that what happens at the cell surface has little influence on tumorigenesis, this does not seem to be the case – although how this influence is exerted is unclear. One possibility is that receptor activation at the cell surface results in an enhanced propagation of the signal, caused by alterations in the mutated components and, further, by the crosstalk between the tumorigenic canonical and non-canonical JNK signalling pathways. In this context, the tumour suppressor activity of SFRPs seems logical because it fits well with their different functions as Wnt-signalling modulators and underscores their importance in the aetiology of cancer (Rubin et al., 2006). However, SFRPs have been also reported to have tumour-promoting activities, in many cases linked to the aforementioned role in apoptosis (Rubin et al., 2006).

In line with a tumour suppressor function of SFRPs, loss or significant downregulation of SFRP1 or SFRP3 expression has been observed in a large proportion of invasive carcinomas, such as in breast (Turashvili et al., 2006; Zhou et al., 1998), gastric (To et al., 2001), cervical (Ko et al., 2002), hepatocellular (Huang et al., 2007) and prostate (Zi et al., 2005) tumours. Conversely, restoring SFRP expression in various cancer cells attenuates their tumorigenic behaviour (Zi et al., 2005), decreases β -catenin stabilisation and promotes cell death even when downstream components of the canonical pathway are mutated (Suzuki et al., 2004). Similarly, relief of Myc-mediated repression of SFRP1 reduces Myc-dependent transforming activity in mammary cells (Cowling et al., 2007).

Two different mechanisms participate in the loss of SFRP expression in cancer cells: allelic loss and epigenetic silencing. The *sfrp1* (8p11-12) and *sfrp3* (2q31-33) loci are commonly associated with deletions and the loss of heterozygosity in a variety of cancers (Leach et al., 1996), including those of the breast and lung, and colorectal carcinomas or neuroblastomas (Leyns et al., 1997; Ugolini et al., 1999). Promoter hypermethylation often accounts for the loss of expression of tumour suppressor genes (Herman and Baylin, 2003) and may explain low levels, or even absence, of SFRPs when no modifications of the gene copy number can be seen (Armes et al., 2004). *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* and *SFRP5*, but not *SFRP3*, have dense CpG islands that flank the first exon. These sequences have been reported to be hypermethylated in many types of carcinoma, particularly colorectal, gastric mammary and renal cell (Caldwell et al., 2004; Lee, A. et al., 2004; Stoehr et al., 2004; Suzuki et al., 2002; Takada et al., 2004; Zhou et al., 1998), possibly predisposing to pre-malignant changes (Suzuki et al., 2004).

Interestingly, the remarkably elevated SFRP4 levels in tumours associated with osteomalacia (a condition in which the bone becomes soft and flexible, often as a result of the lack of vitamin D) led to the unexpected discovery that SFRP4 plays an important role in homeostasis of phosphorus and inorganic phosphate (P_i), by inhibiting synthesis of vitamin D and, thus, intestinal absorption of P_i (Berndt and Kumar, 2007). The infusion of SFRP4 into rats results in phosphaturia that is associated with an increase in β -catenin phosphorylation, suggesting that this effect of SFRP4 involves Wnt signalling, although a decrease in abundance of Na^+ - P_i co-transporters has also been reported (Berndt and Kumar, 2007). Irrespective of the mechanism of action, SFRP4 has an

important role in tissue homeostasis, because P_i is required for basic cell processes including nucleic-acid synthesis, energy metabolism, membrane function and bone mineralisation (Berndt and Kumar, 2007).

In addition to SFRP4, other SFRPs contribute to bone development and homeostasis. In particular, SFRP1 participates in this process through the aforementioned interaction with RANKL (Hausler et al., 2004) and as reflected by the phenotype of *Sfrp1*-null mice (Satoh et al., 2006). Similarly, SFRP3 has been associated with the development of osteolysis or heterotopic ossification (Gordon et al., 2007). Interestingly, a decrease in the activity of other Wnt inhibitors, such as Dickkopf-1 or sclerostin, is also associated with an increase in bone-mass formation, whereas loss-of-function mutations in LRP5 cause osteoporosis, suggesting an important general role of Wnt signalling in bone formation (Baron and Rawadi, 2007). A possible molecular basis for this function of Wnt was suggested by the recent demonstration that Wnt signalling through GSK3 activation enhances BMP signalling, which potentially induces bone morphogenesis (Fuentetaja et al., 2007).

Elevated levels of SFRP1 have also been reported in the retinas of patients affected by retinitis pigmentosa, an inherited disease characterised by the progressive loss of photoreceptors (Hackam, 2005; Hackam et al., 2004). Although *SFRP1* maps close to a locus associated with an uncharacterised form of retinitis pigmentosa, no mutations have been found in a cohort of screened patients (Garcia-Hoyos et al., 2004). Nevertheless, abnormal expression of SFRPs and other components of the Wnt signalling pathways have been detected in a number of mouse models of the disease (Hackam, 2005; Jones et al., 2000), supporting the possibility that alterations in the Wnt signalling pathway are involved in the progression of photoreceptor degeneration. Alternatively, elevated SFRP expression might represent an attempt by the tissue to promote the generation of photoreceptors, as seen during the development of the chick retina (Esteve et al., 2003). If this were the case, SFRPs could be considered as potentially valuable therapeutic tools, as already suggested by Mirotsoy and colleagues, who found that treatment of myocardiocytes with SFRP2 promoted cell survival and repair (Mirotsoy et al., 2007). Nevertheless, the elevated levels of SFRPs reported in the pathological conditions described above as well as in other less characterised examples (Imai et al., 2006; Koza et al., 2006; Mirotsoy et al., 2007; Surendran et al., 2005) suggest that these molecules could also be valuable therapeutic targets.

Conclusions and perspectives

We have discussed the evidence that SFRPs are proteins with a wide range of activities beyond their role as multifunctional regulators of Wnt signalling. Extracellular antagonists exist for most cell signalling pathways as a means to provide fast and precise control of the input a cell receives. The function of SFRPs as modulators of Wnt, BMP or possibly other cell signalling pathways may deserve more attention in the future, particularly from developmental and cell biologists. Indeed, we still need to understand how embryonic cells integrate the different information provided by the multiple signals to which they are exposed. A key to this integration might be the existence of pleiotropic signal regulators. In fact, in addition to Sizzled, Shifted (the *Drosophila* homolog of WIF1) controls and facilitates the diffusion of Hedgehog (Gorfinkel et al., 2005), whereas in vertebrates it acts as a Wnt-binding factor (Hsieh et

al., 1999). Cerberus, a secreted protein that binds and antagonises Wnt, BMP and Nodal signalling (Piccolo et al., 1999) is another example.

In-depth analysis and inter-species comparisons of the phenotypes that result from the modulation of SFRP expression with different genetic and pharmacological tools might also offer new perspectives. Currently, the relatively strong phenotypes observed after knockdown of SFRP activity in lower vertebrates (Esteve et al., 2004; Houart et al., 2002) contrast with the relatively mild or absent phenotypes observed after genetic inactivation in mice (Bodine et al., 2004; Leaf et al., 2006; Satoh et al., 2006). Functional redundancy due to overlapping expression in mammals may explain this discrepancy (Satoh et al., 2006). Robust and multilayered control of key signalling pathways may be another possibility, as the abrogation of other key regulators such as Cerberus, Cerberus-like, chordin and Noggin have unexpectedly generated minor or no abnormalities in their respective mouse mutants (Borges et al., 2001). Future studies should clarify how SFRP activity is integrated into cellular signalling pathways, and might identify further Wnt-dependent and -independent roles for SFRPs.

Work in our laboratory is supported by grants from the Spanish MEC (BFU-2004-01585), the Fundación la Caixa (BM04-77-0), the Fundación Mutua Madrileña (2006-0916), and Comunidad Autónoma de Madrid (CAM, P-SAL-0190-2006).

References

- Adell, T., Thakur, A. N. and Muller, W. E. (2007). Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. *Cell Biol. Int.* **31**, 939-949.
- Armes, J. E., Hammet, F., de Silva, M., Ciciulla, J., Ramus, S. J., Soo, W. K., Mahoney, A., Yarovaya, N., Henderson, M. A., Gish, K. et al. (2004). Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene* **23**, 5697-5702.
- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A. and Aaronson, S. A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 16180-16187.
- Banyai, L. and Pathy, L. (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.* **8**, 1636-1642.
- Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G. and Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* **125**, 509-522.
- Baron, R. and Rawadi, G. (2007). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* **148**, 2635-2643.
- Bartscherer, K., Pelt, N., Ingelfinger, D. and Boutros, M. (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* **125**, 523-533.
- Berndt, T. and Kumar, R. (2007). Phosphatins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 341-359.
- Bhat, R. A., Stauffer, B., Komm, B. S. and Bodine, P. V. (2007). Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. *J. Cell. Biochem.* **102**, 1519-1528.
- Bodine, P. V. and Komm, B. S. (2006). Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **7**, 33-39.
- Bodine, P. V., Zhao, W., Kharode, Y. P., Bex, F. J., Lambert, A. J., Goad, M. B., Gaur, T., Stein, G. S., Lian, J. B. and Komm, B. S. (2004). The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1222-1237.
- Borello, U., Buffa, V., Sonnino, C., Melchionna, R., Vivarelli, E. and Cossu, G. (1999). Differential expression of the Wnt putative receptors Frizzled during mouse somitogenesis. *Mech. Dev.* **89**, 173-177.
- Borges, A. C., Marques, S. and Belo, J. A. (2001). The BMP antagonists cerberus-like and noggin do not interact during mouse forebrain development. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 441-444.
- Bovalenta, P. and Marti, E. (2005). Introduction: unexpected roles for morphogens in the development and regeneration of the CNS. *J. Neurobiol.* **64**, 321-323.
- Bovalenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P. (2006). Frizzled/Ryk mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399-4408.
- Bradley, L., Sun, B., Collins-Racie, L., LaVallie, E., McCoy, J. and Sive, H. (2000). Different activities of the frizzled-related proteins frzb2 and sizzled2 during Xenopus anteroposterior patterning. *Dev. Biol.* **227**, 118-132.
- Cadigan, K. M. and Liu, Y. I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* **119**, 395-402.

- Caldwell, G. M., Jones, C., Gensberg, K., Jan, S., Hardy, R. G., Byrd, P., Chughtai, S., Wallis, Y., Matthews, G. M. and Morton, D. G. (2004). The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **64**, 883-888.
- Carron, C., Pascal, A., Djiane, A., Boucaut, J. C., Shi, D. L. and Umbhauer, M. (2003). Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/beta-catenin pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2541-2550.
- Chang, J. T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G. et al. (1999). Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 575-583.
- Chapman, S. C., Brown, R., Lees, L., Schoenwolf, G. C. and Lumsden, A. (2004). Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. *Dev. Dyn.* **229**, 668-676.
- Chong, J. M., Uren, A., Rubin, J. S. and Speicher, D. W. (2002). Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J. Biol. Chem.* **277**, 5134-5144.
- Chuman, Y., Uren, A., Cahill, J., Regan, C., Wolf, V., Kay, B. K. and Rubin, J. S. (2004). Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1. *Peptides* **25**, 1831-1838.
- Collavin, L. and Kirschner, M. W. (2003). The secreted Frizzled-related protein Sizzled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. *Development* **130**, 805-816.
- Cowling, V. H., D'Cruz, C. M., Chodosh, L. A. and Cole, M. D. (2007). c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Mol. Cell Biol.* **27**, 5135-5146.
- Dann, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J. and Leahy, D. J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86-90.
- Dennis, S., Aikawa, M., Szeto, W., d'Amore, P. A. and Papkoff, J. (1999). A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J. Cell Sci.* **112**, 3815-3820.
- Eisenberg, L. M. and Eisenberg, C. A. (2006). Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. *Dev. Biol.* **293**, 305-315.
- Ellies, D. L., Church, V., Francis-West, P. and Lumsden, A. (2000). The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development* **127**, 5285-5295.
- Esteve, P. and Bovolenta, P. (2006). Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 13-19.
- Esteve, P., Morcillo, J. and Bovolenta, P. (2000). Early and dynamic expression of cSfrp1 during chick embryo development. *Mech. Dev.* **97**, 217-221.
- Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J. and Bovolenta, P. (2003). SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* **116**, 2471-2481.
- Esteve, P., Lopez-Rios, J. and Bovolenta, P. (2004). SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mech. Dev.* **121**, 687-701.
- Finch, P. W., He, X., Kelley, M. J., Uren, A., Schaudies, R. P., Popescu, N. C., Rudikoff, S., Aaronson, S. A., Varmus, H. E. and Rubin, J. S. (1997). Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6770-6775.
- Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M. and De Robertis, E. M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**, 980-993.
- Galli, L. M., Barnes, T., Cheng, T., Acosta, L., Anglade, A., Willert, K., Nusse, R. and Burrows, L. W. (2006). Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev. Dyn.* **235**, spc1.
- García-Hoyos, M., Cantalapiedra, D., Arroyo, C., Esteve, P., Rodríguez, J., Riveiro, R., Trujillo, M. J., Ramos, C., Bovolenta, P. and Ayuso, C. (2004). Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies. *Mol. Vis.* **10**, 426-431.
- Gaur, T., Rich, L., Lengner, C. J., Hussain, S., Trevant, B., Ayers, D., Stein, J. L., Bodine, P. V., Komm, B. S., Stein, G. S. et al. (2006). Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.* **208**, 87-96.
- Gordon, A., Southam, L., Loughlin, J., Wilson, A. G., Stockley, I., Hamer, A. J., Eastell, R. and Wilkinson, J. M. (2007). Variation in the secreted frizzled-related protein-3 gene and risk of Osteolysis and heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *J. Orthop. Res.* **25**, 1665-1670.
- Gorfinkel, N., Sierra, J., Callejo, A., Ibanez, C. and Guerrero, I. (2005). The Drosophila ortholog of the human Wnt inhibitor factor Shifted controls the diffusion of lipid-modified Hedgehog. *Dev. Cell* **8**, 241-253.
- Hackam, A. S. (2005). The Wnt signaling pathway in retinal degenerations. *IUBMB Life* **57**, 381-388.
- Hackam, A. S., Strom, R., Liu, D., Qian, J., Wang, C., Otteson, D., Gunatillaka, T., Farkas, R. H., Chowder, L., Kageyama, M. et al. (2004). Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2929-2942.
- Han, X. and Amar, S. (2004). Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) protects fibroblasts from ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 2832-2840.
- Hausler, K. D., Horwood, N. J., Chuman, Y., Fisher, J. L., Ellis, J., Martin, T. J., Rubin, J. S. and Gillespie, M. T. (2004). Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1873-1881.
- He, J., Sheng, T., Stelter, A. A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B. A. and Xie, J. (2006). Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J. Biol. Chem.* **281**, 35598-35602.
- Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042-2054.
- Hino, K., Satou, Y., Yagi, K. and Satoh, N. (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGFbeta, Hedgehog and JAK/STAT signaling pathways. *Dev. Genes Evol.* **213**, 264-272.
- Hoang, B., Moos, M., Jr, Vukicevic, S. and Luyten, F. P. (1996). Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 26131-26137.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-265.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B. and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-436.
- Huang, J., Zhang, Y. L., Teng, X. M., Lin, Y., Zheng, D. L., Yang, P. and Han, Z. G. (2007). Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **7**, 126.
- Illies, M. R., Peeler, M. T., Dechtiaruk, A. and Eitensohn, C. A. (2002). Cloning and developmental expression of a novel, secreted frizzled-related protein from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mech. Dev.* **113**, 61-64.
- Imai, K., Morikawa, M., D'Armiento, J., Matsumoto, H., Komiya, K. and Okada, Y. (2006). Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1615-1620.
- Ingram, W. J., Wicking, C. A., Grimmond, S. M., Forrest, A. R. and Wainwright, B. J. (2002). Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* **21**, 8196-8205.
- Jones, S. E. and Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays* **24**, 811-820.
- Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. and Neal, M. J. (2000). Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *NeuroReport* **11**, 3963-3967.
- Kawano, Y. and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627-2634.
- Kim, A. S., Anderson, S. A., Rubenstein, J. L., Lowenstein, D. H. and Pleasure, S. J. (2001). Pax-6 regulates expression of SFRP-2 and Wnt-7b in the developing CNS. *J. Neurosci.* **21**, RC132.
- Kim, B. M., Buchner, G., Miletich, I., Sharpe, P. T. and Shivdasani, R. A. (2005). The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev. Cell* **8**, 611-622.
- Kispert, A., Vainio, S. and McMahon, A. P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-4234.
- Ko, J., Ryu, K. S., Lee, Y. H., Na, D. S., Kim, Y. S., Oh, Y. M., Kim, I. S. and Kim, J. W. (2002). Human secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. *Exp. Cell Res.* **280**, 280-287.
- Koza, R. A., Nikonova, L., Hogan, J., Rim, J. S., Mendoza, T., Faulk, C., Skaf, J. and Kozak, L. P. (2006). Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet.* **2**, e81.
- Lacher, M. D., Siegenthaler, A., Jager, R., Yan, X., Hett, S., Xuan, L., Saurer, S., Lareu, R. R., Dharmarajan, A. M. and Friis, R. (2003). Role of DDC-4/sFRP-4, a secreted frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ.* **10**, 528-538.
- Lamy, C., Rothbacher, U., Caillol, D. and Lemaire, P. (2006). Ci-FoxA-a is the earliest zygotic determinant of the ascidian anterior ectoderm and directly activates Ci-sFRP1/5. *Development* **133**, 2835-2844.
- Lapraz, F., Rottinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Wu, S. Y., Bradham, C., Loza, M. A., Hibino, T. et al. (2006). RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**, 132-152.
- Leach, R. J., Banga, S. S., Ben-Othmane, K., Chughtai, S., Clarke, R., Daiger, S. P., Kolehmainen, J., Kumar, S., Kuo, M., Macoska, J. et al. (1996). Report of the Third International Workshop on Human Chromosome 8 Mapping. San Antonio, Texas, October 25-27, 1996. *Cytogenet. Cell Genet.* **75**, 71-84.
- Leaf, I., Tennessen, J., Mukhopadhyay, M., Westphal, H. and Shawlot, W. (2006). Sfrp5 is not essential for axis formation in the mouse. *Genesis* **44**, 573-578.
- Lee, A. Y., He, B., You, L., Dadfarman, S., Xu, Z., Mazieres, J., Mikami, I., McCormick, F. and Jablons, D. M. (2004). Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* **23**, 6672-6676.
- Lee, C. S., Buttitta, L. A., May, N. R., Kispert, A. and Fan, C. M. (2000). SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm. *Development* **127**, 109-118.
- Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B. and De Robertis, E. M. (2006). Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tollid proteinases. *Cell* **124**, 147-159.
- Lee, J. L., Lin, C. T., Chueh, L. L. and Chang, C. J. (2004). Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14602-14609.
- Lee, J. L., Chang, C. J., Chueh, L. L. and Lin, C. T. (2006). Secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) decreases susceptibility to UV-induced apoptosis in primary culture of canine mammary gland tumors by NF-kappaB activation or JNK suppression. *Breast Cancer Res. Treat.* **100**, 49-58.
- Leimeister, C., Bach, A. and Gessler, M. (1998). Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family. *Mech. Dev.* **75**, 29-42.

- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S. and De Robertis, E. M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-756.
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S. E. and Wu, D. (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 19883-19887.
- Lin, K., Wang, S., Julius, M. A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr and Luyten, F. P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11196-11200.
- Lisovsky, M., Itoh, K. and Sokol, S. Y. (2002). Frizzled receptors activate a novel JNK-dependent pathway that may lead to apoptosis. *Curr. Biol.* **12**, 53-58.
- Little, S. C. and Mullins, M. C. (2006). Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **78**, 224-242.
- Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D. and Wallace, V. A. (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev. Dyn.* **227**, 323-334.
- Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781-810.
- Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P. A., Kiefer, M. C., Tomei, L. D. and Umansky, S. R. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13636-13641.
- Miquelajauregui, A., Van de Putte, T., Polyakov, A., Nityanandam, A., Boppana, S., Seuntjens, E., Karabinos, A., Higashi, Y., Huyelebroeck, D. and Tarabykin, V. (2007). Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12919-12924.
- Mirotsov, M., Zhang, Z., Deb, A., Zhang, L., Gnechhi, M., Noiseux, N., Mu, H., Pachori, A. and Dzau, V. (2007). Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 1643-1648.
- Muraoka, O., Shimizu, T., Yabe, T., Nojima, H., Bae, Y. K., Hashimoto, H. and Hibi, M. (2006). Sizzled controls dorso-ventral polarity by repressing cleavage of the Chordin protein. *Nat. Cell Biol.* **8**, 329-338.
- Peng, G. and Westerfield, M. (2006). Lhx5 promotes forebrain development and activates transcription of secreted Wnt antagonists. *Development* **133**, 3191-3200.
- Pera, E. M. and De Robertis, E. M. (2000). A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech. Dev.* **96**, 183-195.
- Pfeffer, P. L., De Robertis, E. M. and Izpisua-Belmonte, J. C. (1997). Crescent, a novel chick gene encoding a Frizzled-like cysteine-rich domain, is expressed in anterior regions during early embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 449-458.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-710.
- Rattner, A., Hsieh, J. C., Smallwood, P. M., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2859-2863.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J. M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. and Bovolenta, P. (2005). SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat. Neurosci.* **8**, 1301-1309.
- Roszmusz, E., Patthy, A., Trexler, M. and Patthy, L. (2001). Localization of disulfide bonds in the frizzled module of Ror1 receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 18485-18490.
- Round, J. and Stein, E. (2007). Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 15-21.
- Rubin, J. S., Barshishat-Kupper, M., Feroze-Merzoug, F. and Xi, Z. F. (2006). Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Front. Biosci.* **11**, 2093-2105.
- Salic, A. N., Kroll, K. L., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (1997). Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development* **124**, 4739-4748.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S. and Shimono, A. (2006). Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* **133**, 989-999.
- Schneider, V. A. and Mercola, M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **15**, 304-315.
- Shibata, M., Itoh, M., Hikasa, H., Taira, S. and Taira, M. (2005). Role of crescent in convergent extension movements by modulating Wnt signaling in early *Xenopus* embryogenesis. *Mech. Dev.* **122**, 1322-1339.
- Stoeck, R., Wissmann, C., Suzuki, H., Kneuchel, R., Krieg, R. C., Klopocki, E., Dahl, E., Wild, P., Blaszyk, H., Sauter, G. et al. (2004). Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab. Invest.* **84**, 465-478.
- Surendran, K., Schiavi, S. and Hruska, K. A. (2005). Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2373-2384.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M. P., Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat. Genet.* **31**, 141-149.
- Suzuki, H., Watkins, D. N., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Markowitz, S. D., Chen, W. D., Pretlow, T. P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M. et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **36**, 417-422.
- Takada, T., Yagi, Y., Maekita, T., Imura, M., Nakagawa, S., Tsao, S. W., Miyamoto, K., Yoshino, O., Yasugi, T., Taketani, Y. et al. (2004). Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci.* **95**, 741-744.
- Tendeng, C. and Houart, C. (2006). Cloning and embryonic expression of five distinct sfrp genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expr. Patterns* **6**, 761-771.
- To, K. F., Chan, M. W., Leung, W. K., Yu, J., Tong, J. H., Lee, T. L., Chan, F. K. and Sung, J. J. (2001). Alterations of frizzled (FzE3) and secreted frizzled related protein (hsFRP) expression in gastric cancer. *Life Sci.* **70**, 483-489.
- Trousse, F., Esteve, P. and Bovolenta, P. (2001). Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J. Neurosci.* **21**, 1292-1301.
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G. and Kolar, Z. (2006). Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* **73**, 213-223.
- Ugolini, F., Adelaide, J., Charafe-Jauffret, E., Nguyen, C., Jacquemier, J., Jordan, B., Birnbaum, D. and Pebusque, M. J. (1999). Differential expression assay of chromosome arm 8p genes identifies Frizzled-related (FRP1/FRZB) and Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) as candidate breast cancer genes. *Oncogene* **18**, 1903-1910.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberland, S. and Rubin, J. S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 4374-4382.
- van't, Veer, L. J., van Kessel, A. G., van Heerikhuizen, H., van Ooyen, A. and Nusse, R. (1984). Molecular cloning and chromosomal assignment of the human homolog of int-1, a mouse gene implicated in mammary tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2532-2534.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P. and Moos, M., Jr (1997). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-766.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A. T., Robertson, E. J. and Maas, R. (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev. Biol.* **207**, 176-188.
- Wawrzak, D., Metioui, M., Willems, E., Hendricks, M., de Genst, E. and Leyns, L. (2007). Wnt3a binds to several sFRPs in the nanomolar range. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 1119-1123.
- Wu, C. H. and Nusse, R. (2002). Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41762-41769.
- Wu, W., Glinka, A., Delius, H. and Niehrs, C. (2000). Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr. Biol.* **10**, 1611-1614.
- Yabe, T., Shimizu, T., Muraoka, O., Bae, Y. K., Hirata, T., Nojima, H., Kawakami, A., Hirano, T. and Hibi, M. (2003). Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling. *Development* **130**, 2705-2716.
- Yoshino, K., Rubin, J. S., Higinbotham, K. G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S. Y. and Perantoni, A. O. (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mech. Dev.* **102**, 45-55.
- Zhong, X., Desilva, T., Lin, L., Bodine, P., Bhat, R. A., Presman, E., Pocas, J., Stahl, M. and Kriz, R. (2007). Regulation of secreted frizzled-related protein-1 by heparin. *J. Biol. Chem.* **282**, 20523-20533.
- Zhou, Z., Wang, J., Han, X., Zhou, J. and Linder, S. (1998). Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. *Int. J. Cancer* **78**, 95-99.
- Zi, X., Guo, Y., Simoneau, A. R., Hope, C., Xie, J., Holcombe, R. F. and Hoang, B. H. (2005). Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res.* **65**, 9762-9770.

The Wnt signalling pathway is a complex and widely used mechanism of cell to cell communication, which plays a major role in many homeostatic and developmental processes, including eye formation. Due to its complexity, this pathway is highly regulated at different levels. Secreted Frizzled-related proteins (SFRPs), soluble proteins structurally related to Frizzled (Fz), compose the largest family of extracellular modulator of Wnt signalling. Previous work from the laboratory demonstrated that a specific member of the *Sfrp* family, *Sfrp1*, is strongly expressed throughout eye development in both birds and fishes. In agreement with this distribution, gain- and loss-of-function analysis in chick and medaka fish (*Oryzias latipes*) demonstrated that *Sfrp1* contributes to the specification of the eye field within the anterior neural plate and thereafter regulates retina neurogenesis and retina ganglion cell axon guidance.

Rounds of genome duplication seem to be at the basis of metazoan evolution. While the majority of higher vertebrates have a gene content that corresponds to two rounds of duplication, teleost fishes underwent an additional round, which seems to have generated in many cases sub-fictionalization or neo-fictionalization of the resulting paralog genes. In this thesis we have asked whether the genome of the medaka fish contains an additional *olSfrp1* paralog and whether its functions are similar or complementary to those of the already characterized *olSfrp1*. We report the identification of a cDNA closely related to *olSfrp1* that however, belongs to the related *Sfrp5* subfamily as established by phylogenetic analysis. Similarly to *olSfrp1*, this gene, named *olSfrp5*, is strongly expressed in the developing eye but is additionally expressed in the midbrain and gut primordium. Morpholino-based interference with embryonic *olSfrp5* expression causes microphthalmia and impairs tectal development. These defects are associated with an increase in the rate of both cell proliferation and cell death in the retinal and tectal neuroepithelium. Furthermore, interference with *olSfrp5* levels of expression impairs the patterning of the ventral portion of the optic cup, leading in some cases to a ventral coloboma. These early defects are followed by an abnormal retinal and tectal neurogenesis. In particular, only reduced numbers of photoreceptor and RGC were generated. The projection of RGC axons were however normal.

These results indicate that *olSFRP5* activity is required from optic vesicle stage for the generation of appropriate number of retinal and tectal progenitor cells and is subsequently involved in their differentiation. They also indicate that *olSFRP1* and *olSFRP5* have only partially redundant function during eye development. Whether the phenotype resulting from *olSfrp5* interference is the consequence of impaired canonical or non canonical Wnt signaling or whether additional pathways are involved still need to be determined.